

---

# **IDENTIFICAZIONE ED ANALISI FUNZIONALE DI GENI MEIOTICI IN PIANTA**

---

**Gaetana Cremona**

Dottorato in Scienze Biotechologiche – XXIII ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II





Dottorato in Scienze Biotecnicologiche – XXIII ciclo  
Indirizzo Biotecnologie Vegetali  
Università di Napoli Federico II



---

**IDENTIFICAZIONE            ED            ANALISI**  
**FUNZIONALE   DI   GENI   MEIOTICI   IN**  
**PIANTA**

---

**Gaetana Cremona**

Dottoranda:	Gaetana Cremona
Relatore:	Dott.ssa Clara Conicella
Correlatore:	Dott.ssa Federica Consiglio
Coordinatore:	Prof. Giovanni Sannia



*Ai miei genitori*



# INDICE

## ASPETTI EPIGENETICI DELLA MEIOSI IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

<b>RIASSUNTO</b>	<b>4</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>6</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>	<b>11</b>
<b>1.1 La meiosi</b>	<b>11</b>
1.1.1 Condensazione	11
1.1.2 Coesione	12
1.1.3 Appaiamento e sinapsi	13
1.1.4 Ricombinazione	14
1.1.5 Segregazione	17
1.1.6 Citochinesi e citoscheletro	18
1.1.7 Progressione meiotica	19
<b>1.2 Modifiche istoniche</b>	<b>20</b>
1.2.1 Modifiche istoniche e trascrizione	21
1.2.2 Modifiche istoniche e riparo del DNA	24
1.2.3 Modifiche istoniche e replicazione del DNA	25
1.2.4 Modifiche istoniche e condensazione cromosomica	25
<b>1.3 Acetilazione e metilazione istonica in pianta</b>	<b>25</b>
1.3.1 Acetilazione istonica ed analisi funzionale	26
1.3.2 Metilazione istonica ed analisi funzionale	31
1.3.2.1 Classe I: omologhi di E(Z)	34
1.3.2.2 Classe II: omologhi di ASH1	36
1.3.2.3 Classe III: omologhi di Trithorax	37
1.3.2.4 Classe IV: proteine con un dominio SET ed un dominio PHD	38
1.3.2.5 Classe V: omologhi di Su(var)3-9	39
1.3.2.6 Classi VI e VII	39
<b>1.4 Acetilazione e metilazione istonica in meiosi</b>	<b>40</b>
<b>1.5 Scopi e contenuti della tesi</b>	<b>43</b>
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	<b>44</b>
<b>2.1 Arabidopsis: materiale e allevamento</b>	<b>44</b>
<b>2.2 Analisi molecolari</b>	<b>44</b>
2.2.1 Estrazione DNA e PCR	44
2.2.2 Analisi di espressione	45
<b>2.3 Analisi citologiche</b>	<b>46</b>
2.3.1 Analisi della microsporogenesi	46
2.3.2 Analisi della colorabilità pollinica	46
2.3.3 Immunolocalizzazione	46
<b>2.4 Analisi di germinabilità <i>in vitro</i></b>	<b>46</b>

<b>2.5 Analisi statistiche</b>	<b>46</b>
<b>3. RISULTATI</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Analisi sistematica dei geni HAT/HDAC</b>	<b>47</b>
3.1.1 Identificazione delle linee “knock-out”	47
3.1.2 Screening fenotipico	49
3.1.3 Analisi dei putativi mutanti	50
3.1.4 Analisi funzionale del gene <i>HDA19</i>	52
3.1.5 Geni HAT/HDAC identificati in silico come candidati ad avere un ruolo in meiosi.	55
<b>3.2 Acetilazione e metilazione istonica nella microsporogenesi di Arabidopsis</b>	<b>56</b>
3.2.1 Immunolocalizzazione dei residui di lisina acetilati	56
3.2.2 Immunolocalizzazione dell'H3K4 trimetilato (H3K4me3)	69
<b>4. DISCUSSIONE</b>	<b>72</b>
<b>4.1 Analisi dei geni codificanti per le HAT/HDAC in Arabidopsis</b>	<b>72</b>
<b>4.2 Analisi funzionale del gene <i>HDA19</i></b>	<b>73</b>
<b>4.3 Analisi dei geni HAT/HDAC identificati mediante indagini bioinformatiche</b>	<b>75</b>
<b>4.4 Dinamica delle modifiche istoniche nella meiosi di Arabidopsis</b>	<b>76</b>
<b>LMM DI MICROSPOROCITI DI POMODORO</b>	
<b>5. INTRODUZIONE</b>	<b>78</b>
<b>5.1 Importanza economica del pomodoro</b>	<b>78</b>
<b>5.2 Isolamento specifico di cellule mediante Laser Capture Microdissection (LCM)</b>	<b>78</b>
<b>5.3 Applicazioni della tecnologia LCM</b>	<b>80</b>
<b>5.4 Scopi e contenuti della tesi</b>	<b>81</b>
<b>6. MATERIALI E METODI</b>	<b>82</b>
<b>6.1 Materiale genetico</b>	<b>82</b>
<b>6.2 Isolamento dei microsporociti</b>	<b>82</b>
6.2.1 Preparazione istologica delle infiorescenze	82
6.2.2 Colorazione delle sezioni istologiche	82
6.2.3 Laser Capture Microdissection (LCM)	82
<b>6.3 Estrazione dell' RNA</b>	<b>82</b>
<b>6.4 Analisi Microarray</b>	<b>83</b>
6.4.1 Amplificazione RNA e ibridazione	83
6.4.2 Analisi dei dati e classificazione funzionale dei geni	83
<b>6.5 Analisi Real Time-PCR quantitativa</b>	<b>83</b>



<b>7. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>85</b>
7.1 Analisi istologica dei bocci fiorali di pomodoro	85
7.2 Preparazione dei tessuti per LCM	87
7.3 Cattura dei microsporociti tramite LCM	87
7.4 Quantità, qualità e specificità dell'RNA	87
7.5 Amplificazione dell'RNA ed analisi Microarray	88
7.6 Analisi Real Time-PCR quantitativa	95
<b>8. CONCLUSIONI</b>	<b>96</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>97</b>
<b>APPENDICE</b>	<b>129</b>

## RIASSUNTO

Il lavoro svolto nella presente tesi ha avuto lo scopo di approfondire le conoscenze relative al processo meiotico in una specie modello, *Arabidopsis thaliana*, e in una specie di interesse agrario, il pomodoro (*Solanum lycopersicum*).

In *Arabidopsis* sono stati perseguiti due obiettivi in accordo con il progetto europeo “Systematic Analysis of Factors Controlling Meiotic Recombination in Higher Plants (MeioSys)” nell’ambito del quale è stato effettuato, in parte, questo lavoro di tesi:

- comprendere il ruolo dell’acetilazione istonica in meiosi;
- determinare lo stato dell’acetilazione e della metilazione istoniche nelle fasi della meiosi.

Il primo obiettivo è stato perseguito mediante l’analisi sistematica di 31 geni identificati *in silico* e codificanti per 18 deacetilasi istoniche (HDAC) e 13 acetilasi istoniche (HAT). Tale analisi si è basata sull’impiego di linee di tipo inserzionale (linee SALK e linea CS 31355) o RNAi, ottenute dal NASC. La selezione, effettuata mediante analisi fenotipiche, molecolari e di vitalità pollinica, ha consentito l’identificazione di una linea (CS 31355) che ha un’inserzione nel gene *HDA19* e presenta riduzione nella fertilità della siliqua e del polline. Tale linea caratterizzata da anomalie nei processi meiotici dell’appaiamento, formazione dei crossing-over e segregazione, evidenzia un ruolo meiotico per la deacetilasi istonica *HDA19* e analogie con il mutante iper-acetilato *Atmcc1*, precedentemente caratterizzato presso l’IGV di Portici. Indagini bioinformatiche hanno indicato che altri geni codificanti HDAC, *HDA6* ed *HDA7*, erano candidati ad avere un ruolo in meiosi. La linea RNAi per il gene *HDA6* e quella inserzionale per *HDA7* non hanno presentato anomalie né a livello fenotipico né di fertilità pollinica. I dati derivanti dall’analisi di espressione hanno indicato che la linea RNAi per *HDA6* non è effettivamente un “null mutant” e che la linea SALK per *HDA7* ha questo gene sovraespresso con l’inserzione che agisce come ‘activation-tagging’. Per entrambe le deacetilasi non è possibile, quindi, escludere un loro ruolo in meiosi. In conclusione, tramite l’impiego delle linee SALK ed RNAi è stata identificata una deacetilasi istonica (*HDA19*) con ruolo in meiosi, pur essendosi evidenziate alcune limitazioni legate alle caratteristiche delle linee stesse. Infatti le linee SALK non sempre hanno rispettato le caratteristiche indicate dal NASC rispetto allo stato genetico dell’inserzione. Inoltre, in alcuni casi, si sono verificate l’assenza dell’inserzione o la presenza di inserzioni in più geni.

Il secondo obiettivo è stato quello stabilire lo stato dell’acetilazione e, parzialmente, della metilazione istoniche durante la microsporogenesi in *Arabidopsis* non essendo mai stato descritto in pianta. A questo scopo sono stati impiegati anticorpi in grado di riconoscere i residui di lisina (K) acetilati sull’istone H3 (H3K9K14; H3K9) ed H4 (H4K5; H4K16) e trimetilati sull’istone H3 (H3K4). I risultati hanno mostrato che gli istoni H3 ed H4 sono acetilati nelle diverse fasi meiotiche e che l’acetilazione dell’H3 è più debole nella sottofase zigotene. Questa osservazione è in accordo con i dati di letteratura, in base ai quali risulta che un basso livello di acetilazione dell’H3 in profase I è necessario per una corretta progressione della meiosi. Anche l’acetilazione dell’H4 è risultata stabile laddove era ipotizzabile una dinamica, soprattutto per il residuo K16, in relazione al comportamento dei cromosomi. È infatti noto che l’acetilazione della lisina 16 dell’H4 ha un ruolo nella decondensazione della cromatina. Per la metilazione del residuo K4 dell’istone H3 risulta trimetilato in tutte le fasi della meiosi e non è presente sull’eterocromatina in accordo con l’osservazione che l’H3K4me3 è una modifica associata all’euromatina. I risultati ottenuti

confrontati con quelli della meiosi di mammifero hanno mostrato che i pattern delle modifiche istoniche nella meiosi in pianta sono differenti. Questo potrebbe indicare una diversificazione nella regolazione della cromatina e riflettere le differenze tra i pattern di crescita e sviluppo delle piante rispetto ai mammiferi. La relativa stabilità delle modifiche istoniche durante la meiosi considerata nella presente tesi a livello globale, tuttavia, non esclude che possano esserci variazioni a livello locale.

In *Solanum lycopersicum* l'obiettivo del lavoro di tesi, svolto nell'ambito del progetto MIUR Genopom, è stato la messa a punto di una strategia di Laser Microdissection Microarray (LMM) per identificare geni espressi in meiosi, con particolare interesse per quelli responsabili dell'acetilazione/deacetilazione istonica in pomodoro. Il confronto è stato effettuato tra le cellule madri del polline (microsporociti) nello stadio pre-meiotico/meiotico e le microspore nello stadio uni- e bi-nucleato. Questo approccio, che combina la tecnologia Laser Capture Microdissection (LCM) e l'analisi microarray, ha consentito l'isolamento di 268 geni, di cui 112 specifici e 156 up-regolati durante la meiosi di pomodoro. L'annotazione di questi geni, sebbene parziale e rappresentativa di una parte del genoma, ha indicato la presenza, tra i geni meiosi-specifici, di due geni noti per essere espressi in meiosi, *meiotic serine proteinasi* e *rad51*. Questo risultato, insieme all'assenza di geni specifici del tappeto, la cui presenza sarebbe stata indice di cellule diverse dai meiociti, evidenzia la specificità del tipo di cellule isolate con LCM. L'annotazione, infine, ha consentito di individuare due deacetilasi istoniche espresse in maniera specifica nei meiociti e dunque con un putativo ruolo in meiosi.

## SUMMARY

Meiosis is a modified cell division program essential to all the sexually-reproducing eukaryotes. Starting with DNA replication and followed by two successive nuclear divisions, the major consequences of meiosis are chromosome number halving, reassortment and segregation of genetic information (Zickler and Kleckner, 1998).

To enable correct progression through meiosis, the chromosomes must undergo strictly regulated processes, including alignment of homologous chromosomes, double-strand break (DSB) formation and repair, and establishment of meiosis-specific chromosome structures. These dynamic arrangements, accompanied by the reversible association of multi-protein complexes with chromatin, ensure proper chromosome segregation and production of healthy gametes. A correct segregation requires the establishment of connections between homologs mediated, in most species, by reciprocal recombination events known as crossing over (CO). COs also increase genome diversity by reshuffling alleles over generations, thereby improving the efficacy of natural selection. In eukaryotic organisms, COs initiated by programmed formation of DSBs do not occur randomly along chromosomal DNA but, rather are clustered in small regions of elevated recombination activity. These so-called “hotspots” are surrounded by regions that are essentially devoid of recombination. The factors that determine hotspot location are poorly understood. However, some evidence is increasingly pointing out that hotspot location is influenced by local chromatin structure (Buard *et al.*, 2009) and higher order chromosome structure. Indeed, epigenetic states and, particularly, histone modifications are recognized as playing important roles in these meiotic events (Ivanovska and Orr-Weaver, 2006).

Histone acetylation was shown to be involved in meiotic recombination either by local analysis at hotspots in different organisms (Yamada *et al.*, 2004; Merker *et al.*, 2008) or by genome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* (Mieczkowski *et al.*, 2007). Enrichment of histone acetylation occurs in recombinationally active regions such as chicken immunoglobulin locus, fission yeast *ade6-M26* (M26) locus, budding yeast *HIS4* locus, and mouse hotspot *Psmb9* (Buard *et al.*, 2009). Deletion of a histone acetylase, *Spgcn5*, required for *ade6-M26* hotspot-specific hyperacetylation, led to a partial decrease in DSBs at this locus (Yamada *et al.*, 2004). Vice versa, loss-of-function of a histone deacetylase, *ScRpd3p*, increases *HIS4* hotspot activity (Merker *et al.*, 2008). In *S. cerevisiae*, histone hyperacetylation changes the genomic distribution of meiosis-specific DSBs, elevating DSBs for 5% of yeast genes and reducing DSBs for 7% of the genes (Mieczkowski *et al.*, 2007). *Arabidopsis thaliana* *mcc1* (meiotic control of CO) mutant over-expressing a histone acetylase has revealed compelling evidence of a link between histone acetylation and meiotic recombination in plants, as well (Perrella *et al.*, 2010).

A role in meiotic recombination was played by histone methylation, as well. The tri-methylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) has been shown to define the location of initiation sites for COs in yeast and mouse (Buard *et al.*, 2009; Borde *et al.* 2009). Indeed, DSB formation at well characterized hotspots is strongly reduced in the absence of Set1, the only H3K4 methylase in yeast (Borde *et al.* 2009). Rad6, which mediates methylation of H3K4 through ubiquitylation of the H2B lysine 123, is also required for full level of meiotic DSBs (Yamashita *et al.*, 2004). In mouse, a high level of H3K4me3 was correlated with high recombination activity at two distinct hotspots (Buard *et al.*, 2009). Mouse *Prdm9* gene has been shown to tri-methylate H3K4 and to be expressed specifically in germ cells during meiotic prophase I. Several experiments suggest that *Prdm9* is the *trans*-acting factor that controls hotspot activation in mice as well as the factor that specifically binds to the 13-bp

consensus motif that is common to many human hotspots (Baudat *et al.*, 2010). So far, new insights have been provided to explain the heterogeneous distribution of DSBs along the chromosomes although, the evolution of recombination initiation sites seems to be different between organisms.

The general objective of this PhD project is the study of mechanisms underlying meiotic events, especially recombination, by using the model plant *Arabidopsis thaliana* and a crop, *Solanum lycopersicum*.

The specific aims of PhD work structured in three work packages (WP) are summarized as following:

1. To determine the role of histone acetylation/deacetylation during meiosis in *Arabidopsis*. In particular, the relationship between histone acetylation/deacetylation and recombination has been investigated.
2. To define the pattern of histone H3 and H4 acetylation and H3K4 methylation during male meiosis in *Arabidopsis thaliana* to infer relationships between histone marks and crucial meiotic events.
3. To set up a Laser Micro-dissection Microarray (LMM) approach to identify genes expressed specifically during meiosis in tomato.

WP1 and WP2 have been performed accordingly to EU7FP project “Systematic Analysis of Factors Controlling Meiotic Recombination in Higher Plants (MeioSys)” whereas WP3 accordingly to MIUR project GenoPom.

### **WP1: Analysis of HAT/HDAC knock-out mutants**

Histone acetylation is a reversible process carried out by two classes of enzymes known as histone acetyltransferases (HATs) and histone deacetyltransferases (HDACs). In *Arabidopsis* genome, 18 HDAC and 12 HAT genes have been identified *in silico* (Pandey *et al.*, 2002). The biological function for some of these genes has been investigated showing their involvement in plant development through the transcriptional regulation. The corresponding mutants often showed a low seed set suggesting a likely role in the reproduction, but the meiotic function of these genes was unknown. The first gene (*AtMCC1*), encoding a putative histone acetyltransferase, demonstrated to play a meiotic role was identified in our lab and was not present in Pandey list. *AtMCC1* is involved in pairing, CO distribution and segregation during male meiosis in *Arabidopsis*. In this PhD thesis, a systematic analysis of HATs/HDACs has been performed to identify genes with a meiotic role in *Arabidopsis*. The analysis included 30 genes, firstly identified *in silico*, and the putative HAT gene showing a strong similarity with *MCC1*.

The analysis of HAT/HDAC genes started with the selection of 36 putative knock-out lines (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) including 29 insertional (T-DNA) lines (SALK) and 7 RNAi lines. These lines were screened for “low seed set” phenotype. Afterwards, molecular and cytological analyses were conducted on lines selected during the first screening. The *HDA19* knock-out line, namely CS 31355, confirmed the silique semi-sterility in the following generations and, in addition, showed a reduced pollen viability. The *hda19* mutation segregated as dominant and it was associated with two copies of T-DNA inserted in tandem in the second exon of the corresponding gene. RT-PCR evidenced that *HDA19* gene was expressed but at a lower level than in wild type because of transcript rearrangement.

The mutation in *HDA19* gene caused several abnormalities in microsporogenesis, influencing pairing, recombination and segregation of chromosomes. As compared to wild type meiocytes (PMCs), homologous chromosomes appeared not fully synapsed in *hda19* pachytene. At diakinesis and metaphase I, two univalents occurred at a

frequency of 17% of PMCs indicating a failure of the obligate CO, that ensures chromosome association and correct segregation. In *hda19*, aberrant prophase II PMCs showing either premature dissociation of chromatids or a mixture of chromosomes/chromatids irregularly associated were observed. The above-described defects could be ascribed to histone hyperacetylation as a consequence of *HDA19* inactivation. Accordingly, abnormalities in pairing, CO distribution and segregation were also observed in hyperacetylated *Atmcc1* mutant. In other organisms, histone hyperacetylation induced by treatment with histone deacetylase inhibitors lead to chromosome segregation defects in mouse (De La Fuente *et al.*, 2004; Akiyama *et al.*, 2006) and porcine (Wang *et al.*, 2006) female meiosis. Immunolocalization experiments showed that centromeres are hypoacetylated in human and in *Drosophila* (Sullivan and Karpen, 2004) and further evidences were provided for the role of histone deacetylation in epigenetic control of centromeric heterochromatin (Ekwall *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 2001; Cimini *et al.*, 2003; De La Fuente *et al.*, 2004). Together, these data reveal a general requirement of histone deacetylation for proper segregation of sister chromatids/chromosomes in meiotic cells.

*In silico* analysis evidenced some HDACs, HDA6, HDA7, and HDA9 as strong candidates having a meiotic role (Aiese Cigliano R., personal communication). RNAi line for *HDA6* and SALK line for *HDA7* showed full fertility both for silique and pollen. However, molecular analysis showed that these lines were not knock-out as evidenced by RT-PCR. Indeed, *HDA6* gene expression was only slightly reduced in the RNAi line while *HDA7* showed to be over-expressed in the SALK line. Moreover, the SALK line for *HDA9* did not show insertion in the expected locus. These results do not allow us to conclude about a meiotic role for these genes in *Arabidopsis*.

As a conclusion, the systematic analysis of HATs and HDACs in *Arabidopsis* leads to the identification of *HDA19* as affecting microsporogenesis. However, a strategy based on the employment of SALK and RNAi lines limited the outcome of the massive analysis due to some problems including lack of T-DNA insertion, multiple insertions, incomplete silencing in RNAi lines.

## **WP2: Pattern of histone modifications during male meiosis in *Arabidopsis thaliana***

The histone modification pattern is well documented in mammalian oocytes. In particular, it has been observed that N-terminals of nucleosome core histones, H3 and H4, are acetylated at prophase I and deacetylated globally at MI and MII in mouse oocyte (Kim *et al.*, 2003; Sarmiento *et al.*, 2004), whereas acetylation was not constantly lost in metaphase chromosomes in porcine oocyte (Wang *et al.*, 2006). In contrast to acetylation, the methylation status of different lysine residues on histone H3 and H4 appears relatively stable during oocyte maturation (Gu *et al.*, 2010). A full survey of histone modification dynamics during meiosis is not reported in plants, to date. A brief description of acetylated histones H3 and H4 is available in *Arabidopsis ask1* mutant in comparison to wild-type (Yang *et al.*, 2006).

The present PhD thesis focused on the pattern of histone H3 and H4 acetylation and H3K4 methylation during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*. Immunolocalization experiments were performed with antibodies raised against acetylated lysine (K) at residues 9 and/or 14 or only residue 9 of histone H3 (H3K914ac, H3K9ac), and acetylated K5 or K16 of histone H4 (H4K5ac, H4K16ac) in Col-0 ecotype. The occurrence of methylated lysine was investigated using an antibody raised against trimethylated K4 of histone H3 (H3K4me3). The study of this specific mark stems from the recent observations in yeast and mammals showing its crucial role in meiotic

recombination (Buard *et al.*, 2009; Borde *et al.*, 2009). Our results showed that histone acetylation and methylation were stable throughout meiosis. The signal for H3K9K14ac colocalized with DNA around the nucleolus and with the condensed chromosomes. A uniform signal was observed during meiosis with the exception of a weaker signal observed during zygotene according to studies showing a decrease in H3 acetylation level at prophase I that seems to be necessary for a proper progression of meiosis (Boateng *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2006; Perrella *et al.*, 2010). Histone H4 showed to be uniformly acetylated at K5 and K16 during all stages of meiosis. Since acetylation of H4K16 is known to influence chromatin organization *in vitro* it was expectable that this mark could have a more dynamic behaviour (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). However, the uniformity of histone acetylation observed at global level in this thesis does not exclude changes at local level that are not be detectable by the adopted method. In conclusion, it is conceivable that the differences in acetylation dynamics observed during meiosis in *Arabidopsis* respect to mammalian could reflect a different regulation at chromatin level in germ cells. Finally, H3K4me3 co-localized with chromosomes in the meiotic stages so far examined. In the stages, where it is possible to distinguish eu- and heterochromatin domains, this histone mark resulted to be absent from heterochromatic blocks in agreement to studies evidencing H3K4me3 associated to euchromatic regions (Kouzarides *et al.*, 2007).

### **WP3: Laser Microdissection Microarray to identify meiotic genes in *Solanum lycopersicum***

Tomato is one of the major crops grown all over the world. Improving our knowledge of molecular mechanisms regulating meiosis in tomato could have interesting applications. However, efficient tools for forward and reverse genetics approaches developed for *Arabidopsis* are not yet routinely available for tomato.

The aim of this PhD thesis is to set up a Laser Microdissection Microarray (LMM) approach to identify genes expressed during meiosis in tomato. In particular, we are interested in the identification of HAT/HDAC genes specifically expressed during meiosis.

Toward the completion of this goal, a cell-specific transcriptional profiling has been applied to compare meiocytes at pre-meiotic/meiotic stages (Pollen Mother Cells, PMCs) with microspores. Target cells were captured from sectioned anthers using Laser Capture Microdissection (LCM) system. Basically, a thermoplastic film adheres to the cells selected with an inverted microscope. Evidences in other species indicate that LCM is a powerful tool for isolating specific tissues, cell types and organelles in a manner conducive to the extraction of RNA, DNA or protein (Nelson *et al.*, 2006; Nakazono *et al.*, 2003; Klink *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2010; Barra, 2008). This represent a very important advantage for the study of reproductive cells considering that previous transcriptomic studies employed whole organs such as stamens or florets, which are composed of mixed types of cells.

Preliminary experiments were performed to identify the developmental stages of PMCs and microspores as related to floral bud size. Moreover, laser parameters including power, duration and spot size, were set up to perform a high capture efficiency and specificity. The LMM experiment performed at Biogem lab (Ariano Irpino, AV) involved three biological replicates for each cell type. More than 10000 meiocytes and 6000 microspores were captured and high quality RNA was extracted. The polyA<sup>+</sup> mRNA was then amplified for microarray hybridization on "GeneChip Tomato Genome Affimetrix" covering about 25% of the currently predicted tomato genes/loci. A total of 631 genes resulted differentially expressed between PMCs and

microspores. Among them, 112 and 156 were PMC-specific and up-regulated in PMCs, respectively. Although, the microarray chip was not representative of all the tomato transcriptome, two genes specifically associated with meiosis were identified among PMC-specific genes thus demonstrating the effectiveness of our experiment. Moreover, the specificity of the capture was demonstrated by the absence of a gene specifically associated with the tapetum (*TOMA108*), which surrounds the male reproductive cells. Finally, two histone deacetylases have been identified among PMC-specific genes thereby suggesting a specific role during meiosis in tomato and thus supporting a more general involvement of histone deacetylation in plant meiosis. In conclusion, Laser Microdissection Microarray approach was successfully set up to collect PMCs in tomato and to obtain cell specific transcription profiling.



# ASPETTI EPIGENETICI DELLA MEIOSI IN ARABIDOPSIS THALIANA

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 La meiosi

La meiosi è un processo di divisione cellulare essenziale per la riproduzione sessuale negli eucarioti, la cui funzione è quella di generare cellule germinali che contengono la metà del materiale genetico delle cellule parentali. La fusione delle cellule germinali ristabilisce nella progenie la ploidia iniziale (Ma, 2006).

Diversamente da quello che accade in mitosi dove ad un ciclo di replicazione del DNA segue un ciclo di divisione nucleare, in meiosi dopo un solo ciclo di replicazione del DNA si verificano due cicli di divisione nucleare denominati meiosi I e meiosi II. La meiosi I è caratterizzata dalla ricombinazione e dalla segregazione dei cromosomi omologhi (divisione riduzionale), mentre la meiosi II è simile alla mitosi e risulta nella segregazione dei cromatidi fratelli (divisione equazionale). Sia nella meiosi I che nella meiosi II si riconoscono quattro fasi: profase, metafase, anafase e telofase. La profase della meiosi I è ulteriormente suddivisa, in accordo con le caratteristiche citologiche dei cromosomi, in 5 sottofasi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi (Dawe, 1998; Zickler and Kleckner, 1999; Stack and Anderson 2001; Armstrong and Jones, 2003).

All'inizio della profase I, nella sottofase del **leptotene** i cromosomi cominciano a condensare, formando strutture simili a sottili filamenti definite "elementi assiali". Affinchè la separazione degli omologhi avvenga in maniera appropriata, è innanzitutto necessario che essi si riconoscano l'un l'altro all'inizio della profase; questo riconoscimento si manifesta con l'appaiamento, ossia un'associazione transiente tra gli omologhi a cui fa seguito la giustapposizione, ed infine la sinapsi. La sinapsi comincia nella sottofase dello **zigotene** e stabilisce un'interazione estesa e stabile tra i cromosomi omologhi che coinvolge la formazione di una struttura proteica complessa chiamata "complesso sinaptinemale" (SC) (Roeder, 1990). Il completamento della sinapsi e della formazione dell'SC definisce la sottofase del **pachitene**, in cui ciascuna coppia di cromosomi omologhi appare come un unico sottile filamento. Nel **diplotene** l'SC è disassemblato e gli omologhi si separano tranne che a livello dei chiasmi, che rappresentano i punti in cui sono avvenuti i "crossing over" (CO) tra i cromatidi non fratelli. La successiva ulteriore condensazione dei cromosomi omologhi uniti, chiamati bivalenti in un organismo diploide, definisce l'ultima sottofase, la **diacinesi**. Durante la profase I si verifica uno degli eventi cruciali della meiosi, la ricombinazione, che risulta, oltre che nella conversione genica, nei CO ossia nello scambio di regioni cromosomiche tra gli omologhi.

In **metafase I**, i bivalenti si attaccano al fuso meiotico e si allineano all'equatore della cellula con i centromeri orientati verso poli opposti. In **anafase I** i cromosomi omologhi, in seguito alla rimozione delle coesine lungo i bracci cromosomici, migrano verso i poli opposti della cellula e, in **telofase I**, decondensano parzialmente prima dell'inizio della seconda divisione meiotica. Di seguito si descrive il processo meiotico di una specie dicotiledone poiché una monocotiledone si differenzia per le modalità di citochinesi.

I cromosomi condensano nuovamente in **profase II** e si allineano su due piani di divisione in **metafase II**. In **anafase II** i cromatidi fratelli si separano e, in **telofase II**, ricostituiscono 4 nuclei, ciascuno contenente un numero aploide di cromosomi. La **citochinesi**, infine, produce 4 cellule aploidi (Ross *et al.*, 1996; Armstrong and Jones, 2001).

La fase più complessa e di maggior durata della meiosi è la profase I. Esperimenti di "time course", utilizzando la 5-bromo-2-deoxyuridine, hanno infatti dimostrato che, in *Arabidopsis thaliana*, la durata della sottofase leptotene è di 6 ore, delle sottofasi zigotene/pachitene di 15, mentre le restanti fasi della divisione meiotica avvengono in circa 3 ore. La fase G<sub>2</sub> del ciclo meiotico avviene invece in 9 ore, determinando una durata complessiva della meiosi, dalla fine della fase di replicazione del DNA allo stadio di tetrade, di circa 33 ore, alla temperatura di 18,5°C.

La condensazione, la coesione tra i cromatidi fratelli, l'appaiamento, la sinapsi, la ricombinazione e la corretta segregazione dei cromosomi omologhi sono gli eventi che caratterizzano la meiosi. Questi saranno trattati singolarmente nei successivi paragrafi sebbene siano correlati tra loro. Infatti mutazioni in un singolo gene hanno spesso ripercussioni in due o più eventi contemporaneamente.

### 1.1.1 Condensazione

La condensazione dei cromosomi è essenziale per il successo della segregazione sia in meiosi che in mitosi. Nel lievito e negli animali è stato identificato un gruppo di proteine altamente conservato, chiamato "Structural Maintenance of Chromosomes (SMCs)", che interagisce con i cromosomi per mantenere elevato lo stato di condensazione (Hirano, 2000; 2002). Negli eucarioti ci sono 6 diversi tipi di proteine SMC, SMC1-6, tra le quali solo SMC2 e SMC4 sono specificamente coinvolte nella condensazione dei cromosomi.

*Arabidopsis* possiede due geni omologhi di SMC2, *AtCAP-E1* ed *AtCAP-E2* (Siddiqui *et al.*, 2003) e un gene omologo di SMC4, *AtCAP-C* (Siddiqui *et al.*, 2006). I mutanti di *AtCAP-E1* (*E1*<sup>-/-</sup>) e *AtCAP-E2* (*E2*<sup>-/-</sup>) sono vitali e fertili, mentre il doppio omozigote (*E1*<sup>-/-</sup> *E2*<sup>-/-</sup>) e *AtCAP-C*<sup>-/-</sup> sono letali per l'embrione. Tuttavia il mutante esprimente una sola copia funzionale del gene *AtCAP-E1* (*E1*<sup>-/+</sup> *E2*<sup>-/-</sup>) esibisce una morfologia anomala dei cromosomi in metafase I ed anafase I che potrebbe essere determinata da difetti nella condensazione dei cromosomi. Il mutante *AtCAP-C*<sup>-/+</sup> mostra invece aberrazioni nella condensazione dei cromosomi del polline in mitosi.

### 1.1.2 Coesione

La coesione dei cromatidi fratelli è responsabile dell'associazione dei cromatidi dal momento della loro formazione, durante la replicazione del DNA, fino all'anafase II. E' essenziale per la segregazione dei cromosomi omologhi, poichè, insieme ai COs, consente il mantenimento dei chiasmi e, quindi, l'unione degli omologhi fino alla transizione metafase I/anafase I. La rimozione della coesione lungo i bracci dei cromosomi permette la separazione degli omologhi in anafase I (Klein *et al.*, 1999; Orr-Weaver, 1999; Watanabe and Nurse, 1999; van Heemst and Heyting, 2000). L'associazione tra cromatidi fratelli permane, invece, al centromero fino all'anafase II. Sia la coesione dei cromatidi fratelli che la sua rimozione sono dunque critiche per la meiosi. Difetti in questi processi possono risultare in una separazione prematura dei cromatidi fratelli e in una segregazione anomala dei cromosomi (Székvölgyi and Nicolas, 2010).

La coesione dipende dal complesso multiproteico delle coesine. In lievito, tale complesso in meiosi comprende almeno 4 proteine: SMC1 e SMC3, SCC3 e REC8. In *Arabidopsis*, l'omologo di REC8, *SYN1/DIF1*, è coinvolto nella corretta coesione tra i cromosomi e nell'appaiamento dei cromosomi omologhi (Cai *et al.*, 2003). Nel mutante *syn1* la coesione tra i bracci cromosomici in leptotene è assente e la coesione a livello dei centromeri è mantenuta fino all'anafase I (Cai *et al.*, 2003).

Come *SYN1* anche *AtSCC3* è necessario al mantenimento della coesione dei centromeri in anafase I (Chelysheva *et al.*, 2005). Nel mutante *atscc3* si osserva infatti una separazione prematura dei cromatidi fratelli già in meiosi I. *Arabidopsis* presenta un gene omologo di *SMC1* (*AtSMC1*) ed uno di *SMC3* (*AtSMC3*). Mutazioni in entrambi i geni sono letali per l'embrione (Liu *et al.*, 2002). Il loro coinvolgimento in meiosi è supportata dalla loro elevata espressione nelle gemme fiorali. Inoltre la proteina *AtSMC3* è stata osservata associata ai cromosomi in cellule meiotiche in maniera dipendente da *SYN1* (Lam *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda la risoluzione dei chiasmi e la separazione dei cromosomi omologhi, entrambe dipendono dalla rimozione di *REC8* lungo i bracci cromosomici operata dalla proteina *ESP* che codifica per una separase in anafase I (Buonomo *et al.*, 2000; Kitajima *et al.*, 2003). Le proteine appartenenti alla famiglia *SGO* proteggono *REC8* dall'azione di *ESP* ai centromeri fino all'anafase II, quando nuovamente la degradazione di *REC8* facilita la separazione dei cromatidi fratelli (Rabitsch *et al.*, 2003; Katis *et al.*, 2004; McGuinness *et al.*, 2005). In *Arabidopsis* il silenziamento del gene *ESP* interferisce con la normale rimozione di *SYN1* dai bracci cromosomici e dai centromeri bloccando il rilascio della coesione in meiosi I e II (Liu and Makaroff, 2006; Yang *et al.*, 2009).

Il mutante *Atask1* mostra anomalie nella separazione e nella segregazione dei cromosomi omologhi in anafase I (Yang *et al.*, 1999). Infatti nei microsporociti di *Atask1* alcuni cromosomi rimangono associati e, quando sottoposti alla tensione dei microtubuli, si frammentano. Il gene *ASK1* codifica per un omologo della proteina *SKP1* che costituisce il complesso *SCF* (*SKP1*, cullin/*CDC53*, F-box protein) (Zhang *et al.*, 1995) coinvolto nel riconoscimento di alcune proteine destinate ad essere degradate dal proteasoma 26 S (Zheng *et al.*, 2002). Il fenotipo in meiosi del mutante *Atask1* suggerisce che il complesso *SCF* sia in questo caso coinvolto nella rimozione dei gruppi di coesine lungo i bracci cromosomici (Ma, 2006) mentre l'accumulo della proteina *ASK1* in leptotene-pachitene (Wang and Yang, 2006) favorisce l'ipotesi che *ASK1* agisca nelle fasi iniziali della profase I e che l'effetto della mutazione sulla separazione dei cromosomi possa essere una conseguenza indiretta (Ma, 2006).

Oltre alle diverse sub-unità delle coesine anche il gene *SWI1/DYAD* è coinvolto nella coesione dei cromatidi fratelli durante la meiosi (Mercier *et al.*, 2001; Agashe *et al.*, 2002). In particolare, nei meiociti maschili di *Atswi* si ha il rilascio della coesione dei bracci cromosomici e del centromero prima della metafase I. Mercier *et al.* (2003) propongono che la proteina *SWI1*, associata ai cromosomi solo in pre-leptotene, sia coinvolta nella promozione della coesione tra cromatidi fratelli ma che non sia responsabile del suo mantenimento.

### 1.1.3 Appaiamento e sinapsi

Il regolare appaiamento e una corretta sinapsi dei cromosomi omologhi contribuiscono ad una accurata segregazione dei cromosomi in meiosi. La configurazione dei cromosomi, definita come "bouquet", dovuta alla "clusterizzazione" dei telomeri su un lato della superficie del nucleo e i successivi movimenti dei cromosomi durante le fasi iniziali della meiosi portano i cromosomi omologhi in stretta prossimità e promuovono il loro riconoscimento ed appaiamento. In *Arabidopsis*, i telomeri sembrano "clusterizzare" sul nucleolo, piuttosto che sulla membrana nucleare (Armstrong *et al.*, 2001).

La stabilizzazione dell'appaiamento degli omologhi è determinato dalla formazione del complesso sinaptonemale (*SC*). L'*SC*, al microscopio elettronico, appare come una struttura tripartita costituita da due filamenti paralleli, che costituiscono gli elementi laterali, formati a partire dagli elementi assiali (Zickler and Kleckner, 1999),

e da un elemento centrale, parallelo agli elementi laterali e ad essi connesso per mezzo degli elementi trasversi (Zickler and Kleckner, 1999; Schwarzacher, 2003; Higgins *et al.*, 2005); l'elemento centrale è costituito dalle teste delle proteine che formano gli elementi trasversi (Zickler and Kleckner, 1999; Higgins *et al.*, 2005).

I mutanti difettivi nell'appaiamento e/o nella sinapsi sono chiamati genericamente "mutanti sinaptici". Questi possono essere classificati come mutanti "asinaptici", che falliscono nello stabilire la sinapsi, o "desinaptici", che non mantengono l'associazione tra gli omologhi dopo la formazione dell'SC. In entrambi i casi si osserva la formazione di univalenti anziché di bivalenti alla fine della profase I (Ross *et al.*, 1997; Caryl *et al.*, 2000; Cai and Makaroff., 2001; Armstrong *et al.*, 2002; Bass *et al.*, 2003; Nonomura *et al.*, 2004). In *Arabidopsis* sono stati isolati due mutanti asinaptici, *asy1* ed *aph2*. *Atasy1* è incapace di formare l'SC sia in meiosi femminile che in quella maschile (Ross *et al.*, 1997; Caryl *et al.*, 2000). La proteina ASY1 si localizza sugli elementi assiali e mostra similarità di sequenza con HOP1 di lievito, implicata nell'assemblaggio dell'SC e nell'allineamento degli omologhi. *AtAPH2* codifica per una proteina che ha un'elevata similarità di sequenza con la proteina HOP2 di lievito, coinvolta nell'appaiamento. I mutanti in questo gene sono difettivi nell'appaiamento e nella formazione dei bivalenti (Liu and Qu, 2008); il mutante *Atdsy1*, invece, è incapace di mantenere la sinapsi, che viene persa all'inizio del diplotene (Caryl *et al.*, 2000; Ross *et al.*, 1997). In tutti questi mutanti si osserva, come sopra riportato, un elevato numero di univalenti in metafase I e, in conseguenza, una segregazione aberrante in anafase I e II.

Sebbene l'SC sia strutturalmente simile negli eucarioti, le proteine che lo costituiscono mostrano una similarità relativa non alla sequenza ma alla struttura secondaria; per questo motivo è stato difficile identificare i componenti dell'SC in *Arabidopsis*. In particolare, tramite una combinazione di strumenti bioinformatici, Higgins *et al.* (2005) hanno identificato 2 omologhi di ZIP1 di lievito: ZIP1a e ZIP1b. Anche in *Arabidopsis* così come in lievito, ZIP1 costituisce una subunità degli elementi trasversi e contribuisce alla formazione della regione centrale dell'SC. In *Arabidopsis* i singoli mutanti in uno dei due geni, *ZIP1a* o *ZIP1b*, mostrano una ridotta fertilità, una riduzione nel numero dei chiasmi e un ritardo nella profase I. Le linee RNAi che non esprimono affatto la proteina ZIP1 mostrano cromosomi non allineati, o, occasionalmente, interamente allineati ma non interamente associati. Sono state osservate, inoltre, associazioni di cromosomi non omologhi e ciò suggerisce un effetto di ZIP1 anche sull'appaiamento.

#### 1.1.4 Ricombinazione

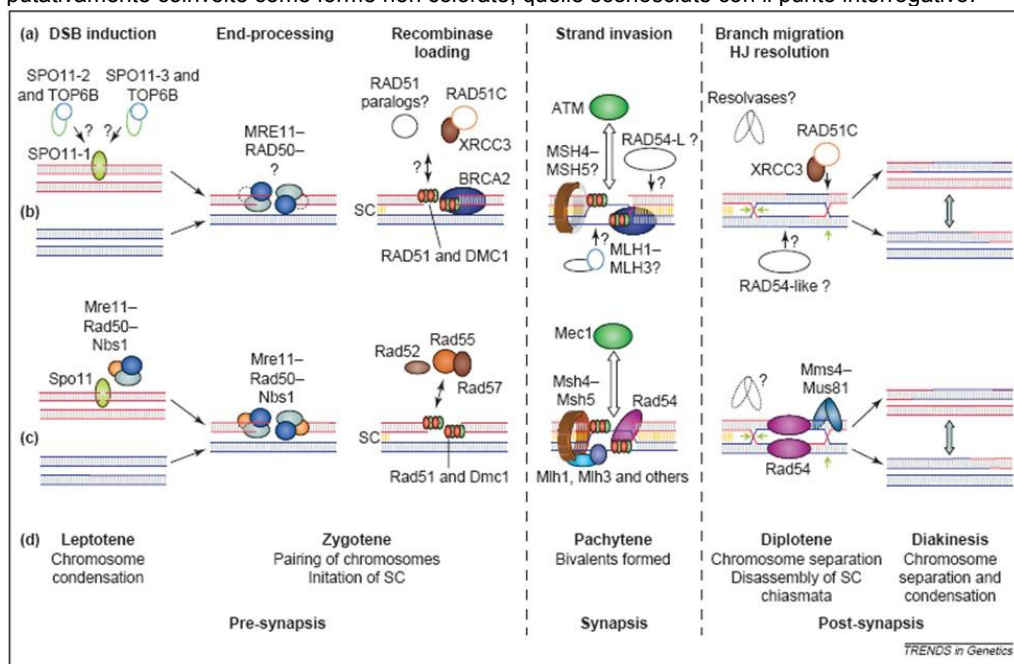
La ricombinazione, a livello di singolo individuo, è un evento biologico critico per il suo successo riproduttivo, poichè è essenziale per il mantenimento dell'associazione dei cromosomi omologhi fino alla transizione metafase I/anafase I e per la corretta segregazione dei cromosomi in anafase I. Infatti, gli omologhi, in assenza dei chiasmi, che costituiscono il link fisico tra i bivalenti dopo il disassemblaggio dell'SC, si separano in cromosomi singoli (univalenti), che segregano in maniera sbilanciata nelle fasi successive (Székvölgyi and Nicolas, 2010). A livello di popolazione e di specie, la ricombinazione, insieme al riassortimento casuale dei cromosomi di origine materna o paterna, determina la redistribuzione del materiale genetico tra le generazioni ed incrementa la diversità genetica tra gli individui all'interno di una popolazione. Questo, ovviamente, ha importanti implicazioni ecologiche ed evolutive (Ma, 2006).

Per spiegare il processo di ricombinazione negli eucarioti è stato proposto, sulla base di studi biochimici in lievito ed in cellule animali, il modello di ricombinazione

chiamato “Double Strand Break Repair” (DSBR) (Szostak *et al.*, 1983). Secondo tale modello la ricombinazione ha inizio con la formazione dei DSBs, ossia di eventi di rottura del DNA che interessano solo uno dei cromosomi omologhi. Le estremità 5' sono degradate, determinando l'estrusione delle estremità 3' (ssDNA). L'estremità 3' libera si appaia con la sequenza complementare dell'omologo intatto (3' strand invasion) formando un “D loop” (Single End Invasion, SEI). Quest'ultimo, in seguito alla sua estensione dovuta alla sintesi del DNA (strand exchange), originerà l'Intermedio di Holliday (dHJ) dopo la cattura dell'altro filamento (Second End Capture SEC); dHJ è risolto dall'azione di nucleasi con la possibilità di ottenere CO o non CO (NCO). Recenti studi supportano una modifica di questo modello secondo la quale la decisione di produrre CO o NCO avviene prima della formazione dell'Intermedio di Holliday (Bishop and Zickler, 2004).

Numerosi geni coinvolti nella ricombinazione meiotica sono stati identificati in lievito (Fig 1A), *C. elegans*, *Drosophila* e in mammiferi. Molte sono le evidenze che supportano la conclusione che, sebbene ci siano variazioni tra gli organismi, negli eucarioti gli intermedi e gli enzimi chiave della ricombinazione sono comuni (Székelyögyi and Nicolas, 2010). In *Arabidopsis*, esperimenti di “reverse genetics” di geni omologhi coinvolti nella ricombinazione hanno dimostrato la conservazione della funzione di questi geni anche nelle piante (Fig 1A).

**Figura 1A:** Rappresentazione dei meccanismi e delle proteine coinvolte nella ricombinazione omologa (HR) durante la prima profase meiotica. In (a) sono riportati i processi principali dell'HR; in (b) e (c) le proteine coinvolte nell'HR in *Arabidopsis* e in lievito, rispettivamente; in (d) è mostrata la morfologia dei cromosomi. Le proteine il cui coinvolgimento è stato sperimentalmente verificato sono mostrate come forme geometriche colorate; quelle putativamente coinvolte come forme non colorate; quelle sconosciute con il punto interrogativo.



Modificata da Schuermann *et al.* (2005).

In *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *Drosophila*, *C. elegans*, ed alcuni mammiferi i DSBs sono generati dalla topoisomerasi II SPO11 (Keeney, 2001; Lichten, 2001; Dernburg *et al.*, 1998; McKim *et al.*, 1998; Romanienko and Camerini-Otero, 1999). In *Arabidopsis* esistono tre omologhi di SPO11 (Hartung and Puchta, 2000; 2001), e due di questi, AtSPO11-1 (Grelon *et al.*, 2001) e AtSPO11-2 (Stacey *et al.*, 2006), mostrano anomalie nella formazione dei bivalenti in profase I ed una notevole riduzione della frequenza di ricombinazione tra i cromosomi omologhi. *Spo11-1* e *Spo11-2* sono inoltre necessari per il corretto appaiamento e per la

regolare sinapsi degli omologhi. AtSPO11-3 non è invece coinvolto in meiosi (Yin *et al.*, 2002).

In lievito, il complesso proteico MRX, costituito da MRE11, RAD50 e NBS1 (XRS2), è richiesto per la formazione ed il processamento dei DSBs indotti da SPO11. In quest'ultimo evento il rilascio di SPO11 dal DNA, oltre che dal complesso MRX, è mediato anche dalla proteina SAE2/COM1.

In *Arabidopsis* sono stati identificati gli omologhi di MRE11, RAD50 e SAE2/COM1 (Hartung and Puchta, 1999, Gallego *et al.*, 2001; Akutsu *et al.*, 2007; Uanschou *et al.*, 2007). A differenza di quanto avviene in lievito, in *Arabidopsis* MRE11e RAD50 non sono essenziali per la formazione dei DSBs ma solo per il processamento e quindi il riparo dei DSBs. Infatti i meiociti di *Atrad50* e *Atmer11*, così come quelli di *Atcom1*, mostrano cromosomi frammentati in profase I; questo suggerisce che si formano i DBS indotti da SPO11, ma che il riparo dei DBS è alterato (Bleuyard *et al.*, 2004b; Puizina *et al.*, 2004; Uanschou *et al.*, 2007). Nei doppi mutanti *mre1-spo11-1* e *com1-spo11* non è stata difatti osservata frammentazione cromosomica.

Nel processamento dei DSBs, iniziato da MRX, COM1 e da esonucleasi richieste per l'estruzione delle estremità 3' di DNA e non ancora identificate, sono coinvolte le proteine RecA DNA ricombinasi RAD51 (Smith *et al.*, 1987; Smith and Wang, 1989; Cox, 1999) e DMC1 (Bishop *et al.*, 1992). Queste proteine si legano ai filamenti singoli di DNA (3' ssDNA) nei siti di DSB, formando dei filamenti presinaptici di nucleoproteine responsabili dell'invasione dell'estremità 3' nel cromosoma omologo intatto (dsDNA), mediante il riconoscimento di sequenze omologhe e la promozione del successivo step di DNA strand exchange. L'interazione tra il filamento singolo di DNA al 3' e il dsDNA costituisce un meccanismo di riconoscimento degli omologhi dipendente dagli eventi di DSBs che permettono l'appaiamento dei cromosomi omologhi. In lievito in assenza di RAD51 e di DMC1 si osserva una bassa (*Scrad51*) o nulla (*Scdmc1*) efficienza di ricombinazione. In *Arabidopsis* il mutante *Atrad51* presenta aberrazioni nell'appaiamento degli omologhi e nella sinapsi mostrando cromosomi ammassati e connessi con ponti di cromatina in metafase I che separandosi si frammentano in anafase I (Li *et al.*, 2004). Le connessioni tra i cromosomi potrebbero essere dovute ad interazioni tra cromosomi non omologhi (Vignard *et al.*, 2007). Nel mutante *Atdmc1* l'appaiamento e la sinapsi falliscono in quanto si osservano in metafase I solo cromosomi univalenti che daranno origine ad una segregazione casuale dei cromosomi e ad una bassissima fertilità. Diversamente da *Atrad51*, nei meiociti di *Atdmc1* non si osserva la frammentazione dei cromosomi in anafase I. Infatti in *Atrad51* il riparo dei DSBs indotti da SPO11 fallisce, mentre in *Atdmc1* i DSBs sono processati da RAD51 mediante la ricombinazione tra i cromatidi fratelli. E' stato difatti dimostrato in lievito e nei mammiferi che *RAD51* è coinvolto nella ricombinazione in mitosi (inter-sister homologous recombination) e che in meiosi *RAD51* processa i DSBs preferenzialmente attraverso la ricombinazione tra cromatidi fratelli; in cellule di lievito in meiosi, quando *dmc1* è silenziato, la ricombinazione avviene solo tra i cromatidi fratelli (Schwacha and Kleckner, 1997). Una funzione di *DMC1* sarebbe quindi quella di prevenire il riparo dei DSBs attraverso la ricombinazione tra i cromatidi fratelli e di favorire la ricombinazione tra i cromosomi omologhi.

Altri geni sono coinvolti nell'invasione dell'estremità 3' nel cromosoma omologo e nell'estensione del D-loop (strand exchange) e tra quelli con una funzione conservata sia in lievito che in pianta vi sono alcuni paraloghi di *RAD51* (*RAD55-RAD57* in lievito, *RAD51C* e *XRCC3* in *Arabidopsis*), *MND1-HOP2/AHP2* e *BRCA2*. In *Arabidopsis* non sono stati invece ancora identificati gli omologhi di *RAD52*, *RAD54*, *RDH54*, *MEC1* e *MEI5* di lievito. *RPA*, indispensabile per il processamento dei DSBs in lievito, è stato identificato in *Arabidopsis*, ma non è risultato essenziale nelle fasi

iniziali del pathway di ricombinazione così come dimostrato in lievito; potrebbe essere coinvolto nello step successivo di "strand end capture".

Così come i CO ed i NCO si originano mediante due distinti pathway, anche la formazione dei CO avviene mediante almeno due diversi pathway in lievito e *Arabidopsis* (Zalevsky *et al.*, 1999; Novak *et al.*, 2001; Copenhaver *et al.*, 2002). Un pathway dipende dall'attività di un set di proteine denominate ZMM (Zip1, Zip2, Zip3, Zip4, Msh4, Msh5 e Mer3), mediante le quali si originano i CO di classe I. Il secondo pathway dipende invece dall'attività del complesso proteico Mus81/Mms4 mediante il quale si originano i CO di classe II. I CO di classe I, a differenza dei CO di classe II, sono soggetti ad interferenza, un meccanismo che impedisce ai CO di avvenire in regioni adiacenti sul cromosoma. In *S. cerevisiae* e in *Arabidopsis* il pathway di ricombinazione dipendente da ZMM è responsabile della formazione della maggior parte dei CO mentre in *C. elegans* della totalità dei CO. In *S. pombe* e in *D. melanogaster*, invece, il pathway di ricombinazione è solo dipendente da MUS81: infatti, non esiste interferenza tra i CO in questi organismi.

I mutanti di lievito appartenenti al gruppo epistatico ZMM, così come i mutanti di *Arabidopsis* nei geni omologhi *AtMSH4*, *AtMSH5*, *AtMER3* e *AtZIP4/AtSPO22*, mostrano una drastica riduzione dei crossing over (85%) e assenza di interferenza tra i CO residui (15%) che hanno una distribuzione per cellula e per cromosoma casuale (Hollingsworth *et al.*, 1995; Mazina *et al.*, 2004; Nakagawa and Kolodner, 2002; Novak *et al.*, 2001; Higgins *et al.*, 2004; 2008; Chen *et al.*, 2005; Chelysheva *et al.*, 2007).

La funzione biochimica delle proteine ZMM non è del tutto chiara ma le evidenze ottenute per MSH4, MSH5 e MER3 supportano l'idea che queste si legano agli intermedi della ricombinazione stabilizzando e direzionando i SEI e dHJ verso il pathway di ricombinazione soggetto a interferenza (Mazina *et al.*, 2004; Snowden *et al.*, 2004). Altre due proteine, MLH1 e MLH3 (MutL Protein), assicurano che i dHJs siano risolti come CO piuttosto che NCO. Il secondo pathway di ricombinazione, non sensibile all'interferenza, richiede l'attività di MUS81 e MMS4/EME1 (Nagakawa and Ogawa, 1999; de los Santos *et al.*, 2003; Bishop and Zickler, 2004; Hollingsworth and Brill, 2004; Stahl *et al.*, 2004). MUS81 è una endonucleasi che può agire sul DNA di diversa conformazione; possiede, infatti, la maggiore attività quando agisce sui D-loops e sugli Intermedi di Holliday prima della cattura della seconda estremità libera dei DSBs (sHJ) (Osman *et al.*, 2003; Whitby, 2005). In *S. pombe* e *S. cerevisiae* i mutanti *mus81/mms4/eme1* hanno un fenotipo severo in meiosi (Boddy *et al.*, 2001; De los Santos *et al.*, 2003): in particolare, nel primo organismo si osservano difetti nella segregazione dei cromosomi e nel secondo un arresto nella progressione della meiosi in profase. In entrambi gli organismi il fenotipo è comunque causato dal fallimento del riparo dei DSBs in quanto i difetti in meiosi sono assenti in presenza di mutazioni che prevengono l'inizio della ricombinazione. In *Arabidopsis* *Atmus81* non mostra difetti evidenti in meiosi. Higgins *et al.* (2008) riportano comunque che sebbene *Atmus81* abbia una frequenza dei chiasmi per cellula (0,85) simile a quella del genotipo controllo, il doppio mutante *Atmsh4/Atmus81* ha una frequenza dei chiasmi minore rispetto a quella osservata in *Atmsh4* (1,25), indicando che *AtMUS81* deve avere un ruolo nella formazione dei CO indipendente da MSH4.

### 1.1.5 Segregazione

L'appaiamento, la sinapsi e la ricombinazione determinano la formazione di bivalenti in diacinesi. La formazione regolare dei bivalenti, però, non è una condizione sufficiente affinché avvenga un'appropriata segregazione dei cromosomi omologhi in anafase I. Infatti prima che questi ultimi possano separarsi, i bivalenti devono migrare

e localizzarsi al centro del fuso meiotico e la coesione tra i cromatidi fratelli deve essere rimossa. L'assemblaggio e la funzionalità del fuso meiotico così come la distribuzione e la successiva degradazione proteolitica delle coesine rappresentano eventi fondamentali per la corretta segregazione dei cromosomi omologhi. Infatti, nel mutante di *Arabidopsis Atatk1*, nel quale la struttura dei microtubuli non è bipolare in pro-metafase I, i bivalenti falliscono il corretto allineamento sulla piastra metafasica e la separazione degli omologhi è asincrona e sbilanciata (Chen *et al.*, 2002).

Anche il mutante *Atmps1* mostra una conformazione caotica dei microtubuli che determina una segregazione distorta dei cromosomi (Jiang *et al.*, 2009). Nel mutante *Atask1*, sebbene la struttura e la morfologia dei microtubuli non risulti alterata (Yang *et al.*, 1999), i difetti nella distribuzione delle coesine (Zhao *et al.*, 2006) determinano una separazione anomala dei cromosomi omologhi in anafase I. Nei meiociti di *Atask1* alcuni cromosomi rimangono associati tra loro e, sottoposti alla tensione del fuso in anafase I, si tendono e si frammentano. In *Atesp* i difetti a livello della coesione, dovuti alla mancata rimozione della coesina REC8 dai bracci cromosomici, interferiscono con la separazione dei cromosomi in anafase I e II (Liu and Makaroff, 2006). In meiosi I, i cinetocori dei cromatidi fratelli sono mono-orientati per permettere l'attacco dei due cromatidi ai microtubuli emanati dallo stesso polo. Nei meiociti dei mutanti *Atsc3* e *Atrec8* la coesione dei centromeri è mantenuta durante la profase ma viene persa in anafase I e i cinetocori hanno un orientamento bipolare anziché monopolare trasformando la prima divisione meiotica in una simile alla mitosi (Chelysheva *et al.*, 2005).

#### 1.1.6 Citochinesi e citoscheletro

Al termine della meiosi II si osservano quattro cluster di cromosomi che andranno a formare i quattro nuclei aploidi, che, separati dalle membrane cellulari e dalle pareti vegetali, generano le quattro microspore (Otegui and Staehelin, 2004). Vi sono due meccanismi della citochinesi: nelle monocotiledoni le pareti cellulari sono assemblate dopo la telofase I e la telofase II (citochinesi successiva); nelle specie dicotiledoni queste si formano dopo la telofase II (citochinesi simultanea). In *Arabidopsis* le due divisioni meiotiche sono seguite da un unico evento di citochinesi. Nelle piante la citochinesi è mediata dal fragmoplasto, formato principalmente da microtubuli e filamenti di actina e costituente l'ossatura per la formazione della nuova parete cellulare. La posizione delle pareti cellulari è determinata dall'interazione tra i microtubuli che si irradiano dalla superficie dei 4 nuclei (Sistema Radiale dei Microtubuli, RMS). Gli RMS definiscono e demarcano i domini citoplasmatici delle future spore. Il fallimento della citochinesi può portare alla formazione di spore con più di un nucleo (sinciziali) o di spore non aploidi. Una citochinesi simultanea prematura, ossia al termine della meiosi I, ha come effetto la formazione di diadi o un arresto della meiosi.

In *Arabidopsis* il mutante *stud/tes* (Hulskamp *et al.*, 1997; Spielman *et al.*, 1997) ha evidenziato anomalie in citochinesi. Al termine delle divisioni meiotiche si osservava una singola microspora con quattro nuclei solo parzialmente separati dalle pareti. I nuclei erano capaci di compiere le successive divisioni mitotiche originando granelli di polline di maggiori dimensioni con quattro nuclei vegetativi e fino ad otto nuclei spermatici. *TES/STD* codifica per una kinesina necessaria per la formazione o il mantenimento dei MT radiali (Yang *et al.*, 2003) coinvolti, come precedentemente indicato, nel determinare i piani di divisione delle microspore. Nel mutante *Atms4* si formano diadi alla fine della meiosi I che persistono durante lo sviluppo delle antere e poi degenerano (Chaudry *et al.*, 1993). In un altro mutante *Atsap* che mostra la produzione di diadi, la meiosi femminile si arresta dopo la prima divisione meiotica



(Byzova *et al.*, 1999). Il ruolo di SAP in microsporogenesi è sconosciuto in quanto le antere degenerano prematuramente.

Durante la progressione della meiosi e la citochinesi i microtubuli/microfilamenti di una fase meiotica sono gradualmente sostituiti o riarrangiati in quelli della fase successiva (Brown and Lemmon, 2001). Mutazioni associate con anomalie del citoscheletro sono, per esempio, quelle associate alla formazione di polline  $2n$ . Nel mutante *Atps1* la maggior parte dei microsporociti mostrano fusi paralleli che originano diadi non ridotte oppure fusi con un orientamento tripolare che originano triadi (d'Erfurt *et al.*, 2008).

#### 1.1.7 Progressione meiotica

Per assicurare il successo di un processo così complesso come quello meiotico è necessario che il tempo e la sequenza dei diversi eventi meiotici siano rigorosamente regolati. Negli organismi animali il controllo della progressione meiotica avviene mediante “checkpoint” che monitorano il completamento della ricombinazione e l'associazione dei cromosomi ai microtubuli (Page-Orr-Weaver, 1997). Nelle piante l'attivazione dei “checkpoint” e dei meccanismi di controllo della meiosi rimangono ancora da chiarire. E' importante, inoltre, sottolineare che nelle piante, diversamente da quello che accade in lievito o in animali, non si ha un arresto della meiosi o apoptosi dei meiociti in seguito a mutazioni in geni meiotici. Per esempio, nel mutante *dmc1* di lievito il fallimento nel riparo dei DSBs comporta un arresto in pachitene (Bishop *et al.*, 1992) mentre in *Arabidopsis* la meiosi comunque si completa.

In *Arabidopsis* il mutante *tam* non entra in meiosi II e si osserva la formazione di diadi alla fine della meiosi I e gameti funzionali non ridotti. *TAM* è cruciale per la transizione dalla meiosi I alla meiosi II e codifica per una ciclina di tipo A. Un altro gene regolatore della meiosi in *Arabidopsis* è *MMD1/DUET* (Reddy *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003). Mutazioni in questo gene causano severi difetti nella progressione meiotica ed incapacità a produrre microspore normali. Nei meiociti di *mmd1* in diacinesi è stata osservata frammentazione cromosomica e contrazione del citoplasma, indicanti un destino di morte cellulare programmata (Yang *et al.*, 2003). I meiociti muoiono prima della citochinesi. Il fatto che i meiociti *mmd1* vadano incontro ad apoptosi, che, come detto precedentemente, è un evento inusuale nelle piante, e che non manifestino difetti meiotici evidenti suggerisce che *MMD1* sia un regolatore generale della meiosi piuttosto che di eventi meiotici-specifici. Il mutante *duet* mostra un fenotipo più attenuato rispetto ad *mmd1*, risultando spesso nella formazione di diadi anziché tetradi (Reddy *et al.*, 2003). Nel mutante *Atsmg7* la meiosi I progredisce regolarmente mentre la meiosi II non si completa. In particolare, *SMG7* è richiesto per la progressione dall'anafase II alla telofase II; infatti, in tarda anafase II i cromosomi appaiono ancora condensati, i fusi meiotici sono irregolari e la citochinesi raramente avviene (Riehs *et al.*, 2008). Recenti studi hanno evidenziato che i geni coinvolti nella decondenzazione dei cromosomi in anafase e nella stabilità dei fusi meiotici sono direttamente regolati dalle CDK-cicline B dipendenti (Vagnarelli *et al.*, 2006; Woodbury and Morgan, 2007). Gli autori ipotizzano che *SMG7* regoli, dopo la separazione dei cromosomi in meiosi II, l'attività delle cicline B mediante la loro degradazione proteasoma-dipendente o influenzandone la stabilità dell'mRNA. Un altro potenziale gene regolatore della meiosi è *MS5/TDM1* (Chaudhury, 1993; Ross *et al.*, 1997). Nei mutanti *Atms5/Attdm1* la meiosi I e II sono regolari, tuttavia, dopo la meiosi II si osserva un'ulteriore divisione che risulta nella formazione di poliadi con 5-8 spore irregolari. *MS5/TDM1* regola quindi il completamento della meiosi II prevenendo che vi sia un'ulteriore divisione.

## 1.2 Modifiche istoniche

Nella cellula eucariotica il genoma è organizzato in un complesso nucleoproteico definito cromatina. La cromatina è un polimero strutturale che consiste di proteine istoniche, cariche positivamente, e dell'acido desossiribonucleico (DNA), molecola basofila (Munshi, 2009). L'unità fondamentale della cromatina è rappresentata dal nucleosoma che è costituito da un ottamero di 4 istoni, H3, H4, H2A ed H2B (2 per ogni tipo), intorno a cui sono avvolte 147 paia di basi di DNA. Questo rappresenta il primo livello strutturale della cromatina ed è chiamato "fibra 10 nm". I nucleosomi sono separati da un DNA linker, di lunghezza variabile, spesso associato con l'istone H1, che promuove un ulteriore impacchettamento del DNA in una struttura a spirale che prende il nome di "fibra 30 nm" e rappresenta uno dei livelli di ordine superiore della cromatina. La cromatina è organizzata in modo da superare la limitazione spaziale esistente all'interno del nucleo e fornire anche una piattaforma dinamica che controlla tutti i processi che coinvolgono il DNA.

Degli istoni si distingue un dominio prevalentemente globulare detto "core" e le code N-terminali che protrudono dalla cromatina (Kouzarides, 2007). Una caratteristica singolare degli istoni, ed in particolare delle loro code, è il numero di modifiche post traduzionali a cui sono soggetti. Tali modifiche comprendono acetilazione della lisina (K), metilazione della lisina (K) e dell'arginina (R), fosforilazione della serina (S) e della treonina (T), ubiquitinazione, sumoilazione e biotinilazione della lisina, isomerizzazione della prolina (P), ed ADP-ribosilazione. Queste modifiche, insieme alla metilazione del DNA, varianti istoniche ed altri meccanismi, contribuiscono all'informazione epigenetica portata dalla cromatina. Attualmente le maggiori informazioni sono relative alle modifiche istoniche covalenti dell'acetilazione, metilazione e fosforilazione. E' stato evidenziato, finora, tramite anticorpi specifici o spettrometria di massa, che più di 60 differenti residui sugli istoni, particolarmente su H3 ed H4, sono substrato per le modifiche post tradizionali, sebbene il numero delle modifiche possibili sia maggiore. Una ulteriore complessità deriva dal fatto che la metilazione sulla lisina o sull'arginina può avvenire in tre forme differenti: mono-, di- o tri-metilazione per la lisina e mono- o di-metilazione (simmetrica o asimmetrica) per l'arginina. L'ampio numero di modifiche degli istoni rappresenta un potenziale notevole in termini di possibilità di risposte funzionali.

Le modifiche possono influenzare direttamente l'organizzazione della cromatina rendendola più compatta o più aperta, agendo sui contatti tra differenti istoni nei nucleosomi adiacenti oppure sulle interazioni degli istoni col DNA. Tra le modifiche istoniche note, l'acetilazione è quella putativamente in grado di aprire la cromatina, poiché neutralizza la carica basica della lisina. Sebbene non ci siano osservazioni *in vivo*, analisi biofisiche indicano che i contatti inter-nucleosomali sono importanti per la stabilizzazione delle strutture di ordine superiore della cromatina. Infatti, la struttura della coda N-terminale dell'H4 è critica per i contatti tra i nucleosomi ed, in particolare, è stato dimostrato che l'acetilazione della lisina 16 sull'istone H4 ha un effetto negativo sulla fibra cromatinica di 30 nm e sulle strutture di ordine superiore (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). Al contrario la fosforilazione istonica, mediante cambio di carica, può influire sul compattamento della cromatina. Il ruolo di questa modifica, però, non è stato ancora dimostrato in modo univoco (Ahn *et al.*, 2005; Fischle *et al.*, 2005; Krishnamoorthy *et al.*, 2006).

Oltre all'azione diretta delle modifiche istoniche sulla cromatina, c'è l'effetto di proteine non istoniche che sono in grado di associarsi alla cromatina o dissociarsi a seconda della composizione delle modifiche di un dato istone. Questa ipotesi è nota

come “codice istonico” (Strahl and Allis, 2000); tuttavia, non è ancora chiaro in che modo il codice sia stabilito e mantenuto.

L’abbondanza di modifiche sulla coda degli istoni rende possibile il loro “cross-talk” a diversi livelli, sia nell’ambito dello stesso istone sia tra code istoniche differenti. Modifiche diverse come acetilazione e metilazione avvengono sui residui di lisina causando forme di antagonismo, come nel caso dell’H3K9. Il legame di una proteina alla cromatina può essere influenzato da una modifica istonica adiacente come, ad esempio, nei mammiferi, la fosforilazione della serina 10 dell’H3 influenza il legame della “proteina eterocromatina 1” (HP1) all’H3K9 metilato (Fischle *et al.*, 2005). Inoltre, l’attività catalitica di un enzima può essere compromessa dalla modifica del suo sito di riconoscimento del substrato come, ad esempio, l’isomerizzazione dell’H3P38 influenza la metilazione dell’H3K36 da parte della metilasi Set2 (Nelson *et al.*, 2006) in lievito. Infine un enzima può riconoscere il suo substrato in modo più efficace in presenza di modifiche istoniche; ad esempio, l’acetilasi istonica GCN5 riconosce l’istone H3 più efficacemente quando è fosforilato alla serina 10 (Clements *et al.*, 2003).

Dal punto di vista funzionale, le modifiche istoniche possono agire globalmente sulla struttura della cromatina oppure regolare specifiche funzioni del DNA. Ci sono due differenti tipi di domini della cromatina nel genoma, ciascuno associato a diverse modifiche: l’eterocromatina, in cui il DNA risulta più inaccessibile e l’eucromatina, che ha una configurazione più aperta. Esperimenti in lievito hanno mostrato che i confini dell’eterocromatina sono mantenuti dalla presenza della metilazione all’H3K4 e all’H3K9 nelle regioni eucromatiche adiacenti (Kouzarides, 2007). Nei mammiferi lo stato eterocromatinico silente è associato con bassi livelli di acetilazione ed alti livelli di alcuni siti metilati (H3K9, H3K27 ed H4K20). Si ritiene che la metilazione dell’H3K27 sia coinvolta nel mantenimento del cromosoma X inattivo (Jeppesen and Turner, 1993), mentre l’H3K9me gioca un importante ruolo nel mantenimento dell’eterocromatina pericentromerica (Kouzarides, 2007).

Nell’ambito delle funzioni associate al DNA, le modifiche istoniche coordinano l’organizzazione della cromatina per garantire una data funzione. Quest’ultima può essere espletata a livello locale, ad esempio la trascrizione di un gene o il riparo del DNA, o a livello di intero genoma, come la replicazione del DNA o la condensazione dei cromosomi (Kouzarides, 2007). Molti studi dimostrano come specifiche combinazioni di modifiche istoniche siano correlate a funzioni biologiche. Di seguito sono riportati alcuni esempi relativi a processi biologici influenzati dalle modifiche istoniche nei mammiferi e negli organismi modello lievito e *Drosophila*. Le modifiche istoniche in pianta saranno, invece, trattate nei paragrafi successivi.

### 1.2.1 Modifiche istoniche e trascrizione

Acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione sono state implicate nell’attivazione della trascrizione; metilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, deiminazione e isomerizzazione della prolina nella repressione. Tuttavia è possibile che una stessa modifica istonica abbia capacità di attivare o reprimere la trascrizione a seconda del contesto, rappresentato dalla cromatina con le altre modifiche epigenetiche.

L’acetilazione, che per la maggior parte dei siti risiede nella coda N-terminale degli istoni, cioè nella porzione più accessibile, è quasi invariabilmente associata all’attivazione della trascrizione e ciò è stato dimostrato per numerosi geni di cui si riporta qualche esempio. Chen *et al.* (2002) hanno mostrato che l’acetilazione istonica incrementa in misura significativa l’espressione basale e quella inducibile da stress del gene hsp-70 in *Drosophila*. Vari attivatori trascrizionali riconoscono i

residui acetilati sugli istoni H3 ed H4. Agalioti *et al.* (2002) hanno investigato la specificità dell'acetilazione delle lisine dell'H3 e H4 ed il reclutamento di co-attivatori specifici per l'Interferone- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). Il promotore di questo gene presenta tre lisine acetilate, H4K8, H3K9 e H3K14, che forniscono segnali distinti per il reclutamento di proteine contenenti il bromodominio: BRG1, che è un componente del complesso di rimodellamento SWI/SNF, e TAFII 250, che è un componente del TFIID. La conversione della lisina H4K8 ad alanina, impedisce il legame di BRG1, mentre la conversione ad alanina di H3K9 o H3K14 impedisce il legame di TAFII 250 (Agalioti *et al.*, 2002). La deacetilazione, invece, è correlata con la repressione della trascrizione, specialmente durante la differenziazione cellulare e lo sviluppo. Le deacetilasi istoniche (HDAC) coinvolte in differenti pathway di trasduzione di segnale sono presenti in numerosi complessi repressivi. In generale non sembrano mostrare specificità per un particolare residuo acetilato, sebbene alcuni enzimi di lievito mostrino specificità per un dato istone (Kouzarides, 2007). Le HDAC non si legano direttamente al DNA, ma sono reclutate su promotori specifici attraverso la loro interazione con fattori di trascrizione sequenza-specifici. In virtù di questa capacità di interagire con vari fattori di trascrizione, che possono associarsi a siti multipli del genoma, le HDAC sembrano essere i principali regolatori dei pathway di differenziamento (Verdin *et al.*, 2003).

A proposito del rapporto tra fosforilazione ed espressione genica le informazioni sono scarse. Nei mammiferi ed in lievito è stato dimostrato il ruolo della fosforilazione H3S10 nell'attivazione di alcune classi di geni (MacDonald *et al.*, 2005). In lievito, è stato osservato che molte chinasi sono presenti sulla cromatina a livello di specifici geni, suggerendo un effetto diretto per questa modifica istonica sull'espressione genica, basato sulla fosforilazione della cromatina e non solo sull'attivazione di proteine di trasduzione del segnale (Pokholok *et al.*, 2006).

Per quanto riguarda la metilazione, le metilasi istoniche della lisina hanno maggiore specificità rispetto alle acetilasi istoniche. Infatti, di solito modificano una singola lisina su un singolo istone e possono attivare o reprimere la trascrizione. Tre siti di metilazione sugli istoni sono implicati nell'attivazione della trascrizione: *H3K4*, *H3K36* e *H3K79*. Tuttavia, gli studi di seguito riportati hanno indicato come le singole modifiche siano in grado di reclutare proteine con funzione sia di attivazione che di repressione della trascrizione. In lievito, l'*H3K4* metilato può essere legato dal fattore di rimodellamento della cromatina Chd1 che recluta, a sua volta, il complesso SAGA (Pray-Grant *et al.*, 2005); quest'ultimo, grazie alla presenza dell'acetiltrasferasi Gcn5, aumenta i livelli di acetilazione e, quindi, la trascrizione. Invece, Briggs *et al.* (2001) e Bryk *et al.* (2002), hanno mostrato che la metilazione dell'*H3K4*, mediata da SET1, è coinvolta nel silenziamento dell'rDNA. Un altro esempio è rappresentato dall'*H3K4me3*; questa modifica si localizza al 5' dei geni attivi ed è stata trovata associata con la forma attivata della RNA Pol II (fosforilata alla serina 5 del suo dominio C-terminale) (Kouzarides, 2007). È quindi sorprendente che la stessa modifica possa essere associata alla repressione trascrizionale; infatti, in uomo, l'*H3K4me3* può essere legato dal complesso di deacetilazione Sin3-Hdac1, che reprime i geni coinvolti nella proliferazione cellulare in risposta ai danni subiti dal DNA (Shi *et al.*, 2006). La metilazione di questo residuo è associata, quindi, sia all'attivazione che alla repressione trascrizionale. Una possibile spiegazione consiste nell'ipotesi che esista una "danza delle associazioni" con complessi "attivanti o repressivi" dipendente dal tempo. I complessi attivanti potrebbero essere reclutati durante l'inizio e l'elongazione della trascrizione, mentre quelli repressivi sarebbero richiamati nelle fasi di attenuazione della trascrizione. Il contesto cromatinico circostante ad una singola modifica sarebbe, quindi, determinante nello stabilire temporalmente le interazioni con i complessi proteici tramite le altre modifiche

istoniche (Berger, 2007). L'H3K36me3 si accumula all'estremità 3' dei geni attivi ed è associato con la fase di elongazione della trascrizione. Inoltre, in lievito, tale modifica è associata alla soppressione di siti di inizio della trascrizione criptici ossia inappropriati perché localizzati all'interno della regione codificante dei geni (Carrozza *et al.*, 2005; Cuthbert *et al.*, 2004; Joshi and Struhl, 2005; Keogh *et al.*, 2005). Infatti la metilazione all'H3K36 recluta la proteina EAF3 che a sua volta lega il complesso deacetilasi Rpd35. La conseguente deacetilazione istonica, a sua volta, determina la "chiusura" della cromatina, successivamente al passaggio della RNA polimerasi II. Tre siti di metilazione della lisina sono correlati alla repressione trascrizionale: H3K9, H3K27 e H4K20. Tra questi, l'H3K9 e l'H3K27 sono assenti in lievito. Nei mammiferi la metilazione dell'H3K9 è implicata sia nel silenziamento dei geni eucromatici sia nella formazione dell'eterocromatina silente. La metilazione dell'H3K9 fornisce una piattaforma per il legame della "proteina eterocromatina 1" (HP1) al promotore dei geni repressi. A sua volta, HP1 si associa con una varietà di altri fattori, inclusi Suv39H1, HDAC, repressori trascrizionali ed enzimi di rimodellamento della cromatina (Hiragami and Festenstein, 2005). Tuttavia, è stato visto che la trimetilazione dell'H3K9 e l'isoforma  $\gamma$  dell'HP1 sono arricchite anche nelle regioni codificanti dei geni attivi (Vakoc *et al.*, 2005). Una possibile spiegazione potrebbe essere che la metilazione dell'H3K9 agisca come attivatore all'interno delle regioni codificanti e come repressore nelle regioni promotrici. Nei mammiferi, l'H3K27me è stata implicata nel silenziamento dei geni HOX, che costituiscono una famiglia di fattori di trascrizione e rappresentano i principali regolatori dello sviluppo animale. Essa, inoltre, è coinvolta anche nell'inattivazione del cromosoma X e nell'imprinting genomico. Si sa molto poco relativamente alla funzione repressiva dell'H4K20me, che ha un ruolo nella formazione dell'eterocromatina e nel riparo del DNA.

La metilazione dell'arginina, come quella della lisina, può agire sia per l'attivazione sia per la repressione della trascrizione e gli enzimi che la determinano, protein-arginin metiltrasferasi (PRMT) si legano al promotore tramite fattori di trascrizione (Lee *et al.*, 2005b). Il promotore più studiato a proposito della metilazione dell'arginina è il promotore pS2 regolato dagli estrogeni, che mostra modifiche cicliche dell'arginina (Metivier *et al.*, 2003). La ragione non è nota, ma si ipotizza che ciò sia legato alla necessità per i geni regolati da estrogeni, di rispondere molto rapidamente agli stimoli, e mantenere quindi la cromatina in una sorta di "stato di allerta" per evitare lo "spegnimento" della trascrizione. Non sono state ancora identificate proteine che specificamente legano gli istoni metilati sulla arginina o enzimi che demetilano l'arginina.

In uomo la deiminazione comporta la conversione dell'arginina dell'H3 o dell'H4 a citrullina da parte dell'enzima PAD4 (Wang *et al.*, 2004b). Essa ha il potenziale di contrastare l'effetto di attivazione della metilazione dell'arginina poiché la citrullina previene quest'ultima modifica (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004a). Inoltre, è stato dimostrato *in vivo* che l'arginina mono-, ma non di-metilata può essere deiminata (Wang *et al.*, 2004a).

L'ubiquitinazione è stata trovata sull'H2A (K119, in uomo) e H2B (K120 in uomo e K123 in lievito). L'ubiquitinazione dell'H2AK119, in uomo, è stata associata alla repressione trascrizionale (Wang *et al.*, 2006); in contrasto l'ubiquitinazione dell'H2BK120 (e dell'H2BK123 in lievito) attiva la trascrizione (Zhu *et al.*, 2005). Il meccanismo con cui l'ubiquitinazione influenza la trascrizione non è chiaro. È probabile che recluti fattori addizionali sulla cromatina, ma potrebbe funzionare anche nel tenere fisicamente aperta la cromatina date le grandi dimensioni della molecola. Per quanto riguarda la deubiquitinazione, in lievito sono stati identificati due enzimi che sono antagonisti dell'ubiquitinazione di H2BK123: Ubp8 (subunità del complesso SAGA con l'acetiltrasferasi), che è richiesto per l'attivazione della

trascrizione, indicando quindi che sia l'aggiunta che la rimozione dell'ubiquitina sono necessarie per la stimolazione della trascrizione, ed Ubp10, che funziona nel silenziamento trascrizionale ai siti eterocromatici (Emre *et al.*, 2005; Gardner *et al.*, 2005).

Anche la sumoilazione è una modifica di grandi dimensioni. E' stata trovata in tutti gli istoni del nucleosoma e sono stati identificati anche siti specifici sull'H4, H2A e H2B (Nathan *et al.*, 2006). In lievito, la sumoilazione è antagonista sia dell'acetilazione sia dell'ubiquitilazione, ed è pertanto repressiva per la trascrizione.

L'isomerizzazione della prolina può convertire questo amminoacido dalla forma *cis* a quella *trans* e viceversa. In lievito è stato identificato un enzima, FRP4, che isomerizza l'H3P38 (Nelson *et al.*, 2006) regolando anche i livelli di metilazione all'H3K36. L'appropriato isomero di prolina è probabilmente necessario per il riconoscimento e la metilazione dell'H3K36 da parte della metiltrasferasi Set2 (Chen *et al.*, 2006).

### 1.2.2 Modifiche istoniche e riparo del DNA

Le modifiche istoniche sono coinvolte nel riconoscimento e nell'accessibilità dei siti dove il DNA deve essere riparato. Nelle cellule di mammifero una delle prime risposte ai danni del DNA è la fosforilazione della variante istonica  $\gamma$ -H2AX, che si estende per molte kilobasi intorno al sito del danno (Fillingham *et al.*, 2006). In lievito è stato osservato che la fosforilazione dell'H2AX richiama il complesso INO80 che ha attività di rimodellamento della cromatina dipendente dall'APT (Van Attikum *et al.*, 2004). In lievito, i siti di riparo del DNA contengono anche l'H4K20 metilata e la proteina del checkpoint del ciclo cellulare, Crb2, che è in grado di determinare un arresto in G2/M allo scopo di riparare il DNA (Sanders *et al.*, 2004). Questa modifica, che è presente in tutto il genoma, in caso di danni al DNA si localizza ai siti del riparo. È possibile che il reclutamento di Crb2 specifico a questi siti avvenga tramite la fosforilazione dell'H2AX. Crb2 infatti possiede il dominio BRCT, coinvolto nel riconoscimento dei residui fosforilati. Quindi, può riconoscere la fosforilazione indotta dai danni al DNA e stabilizzare se stessa sulla cromatina tramite il riconoscimento dell'H4K20me (Du *et al.*, 2006). L'omologo in uomo di Crb2, p53BP1, opera in maniera molto simile (Botuyan *et al.*, 2006). È interessante che sia Crb2 sia p53BP1 riconoscono solo le forme mono- o di-metilate dell'H4K20, suggerendo che la forma tri-metilata dell'istone possa essere implicata in fasi differenti del riparo o in funzioni differenti.

In lievito è stato osservato un ruolo anche per l'acetilazione nel riparo dei danni del DNA. L'acetilazione dell'H3K56 è depositata sugli istoni di nuova sintesi nella fase S. In assenza di danni questa scompare in G2. Tuttavia, in presenza di danni, le deacetilasi HST3 ed HST4 vengono "down" regolate e la modifica persiste (Celic *et al.*, 2006; Maas *et al.*, 2006). L'acetilasi istonica di lievito, Hat1, è un enzima che acetila H4K12 ed è implicato nel riparo del DNA essendo reclutato al sito del riparo (Qin and Parthun, 2006). In uomo, MOF è la principale responsabile della H4K16Ac. Sharma *et al.* (2010) hanno mostrato che una riduzione nei livelli di acetilazione dell'H4K16, a seguito della deplezione di MOF, determina difetti nella risposta ai danni del DNA e nel riparo dei DBS in seguito a radiazioni ionizzanti.

Infine, anche l'ubiquitinazione dell'H3 e dell'H4 (Wang *et al.*, 2006) e la monoubiquitinazione dell'H2A (Bergink *et al.*, 2006) sono state associate al riparo del DNA.

### 1.2.3 Modifiche istoniche e replicazione del DNA

Per il meccanismo della replicazione del DNA, le informazioni finora disponibili indicano una partecipazione solo dell'acetilazione istonica. I dati riguardano l'acetiltransferasi HB01 che, nei mammiferi, acetila l'istone H4; una sua delezione causa una riduzione nella sintesi del DNA e blocca la progressione delle cellule in interfase (Iizuka *et al.*, 2006). In *Drosophila* l'omologo di HB01 è in grado di aumentare la formazione del complesso di pre-inizio della replicazione (Aggarwal and Calvi, 2004).

### 1.2.4 Modifiche istoniche e condensazione cromosomica

La condensazione e decondensazione della cromatina sono processi importanti durante il ciclo cellulare. Due eventi di fosforilazione, nei mammiferi, giocano un ruolo importante in questi processi durante la mitosi. Il primo è la fosforilazione della H3S10 da parte della chinasi Aurora B. Un possibile meccanismo d'azione di questa modifica è rappresentato dall'allontanamento di HP1 da H3K9me, che normalmente compatta la cromatina (Fischle *et al.*, 2005); il secondo evento di fosforilazione è quello all'H3T3, richiesto per il normale allineamento dei cromosomi in metafase (Dai *et al.*, 2005).

Esperimenti *in vitro* forniscono un ruolo per l'acetilazione dell'H4K16 nella decondensazione della cromatina (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). *In vivo* la deacetilasi di classe III, SirT2, che ha specificità per l'H4K16, può indurre la condensazione della cromatina (Vaquero *et al.*, 2006). Consistentemente con questa idea, SirT2 localizza con la cromatina durante la transizione G2/M, quando la cromatina va gradualmente compattandosi.

## 1.3 Acetilazione e metilazione istonica in pianta

Esistono modifiche della cromatina, come la dimetilazione dell'H3K4, che sono state trovate in tutti gli eucarioti finora esaminati; altre, invece, sono specifiche per alcuni organismi. Per esempio, la mono-, di- o tri-metilazione delle lisine 9 e 27 dell'istone H3, oltreché la metilazione del DNA, sono assenti in *Saccharomyces cerevisiae*. Il numero di modifiche post-traduzionali degli istoni sembra essere maggiore negli organismi multicellulari, e ciò suggerisce che l'espansione di tali modifiche sia funzionale per l'evoluzione di organismi complessi (Garcia *et al.*, 2007). Infatti, in un individuo che è caratterizzato da un unico ed invariato genoma, esistono centinaia di epigenomi, ciascuno specifico per tipo cellulare, fase di sviluppo, risposta a stimoli fisiologici e ambientali.

*Arabidopsis* è tra i modelli per lo studio dell'epigenoma negli organismi multicellulari. Più di 20 modifiche istoniche sono state analizzate tramite immunolocalizzazione (Fuchs *et al.*, 2006; Pflüger and Wagner, 2007; Zilberman *et al.*, 2008; Libault *et al.*, 2005; Jacob *et al.*, 2009). In pianta il numero di residui di lisina (K) soggetti a modifiche sulla coda N-terminale degli istoni è maggiore rispetto agli altri eucarioti. In particolare, è stato visto che oltre alle modifiche conservate rispetto a lievito e mammiferi, ci sono modifiche peculiari delle piante che riguardano, sull'istone H4, l'acetilazione del K20 (che può essere anche metilata, come negli altri organismi) e, sull'istone H2B, l'acetilazione di K6, K11, K27 e K32, la fosforilazione della serina S15 e l'ubiquitinazione della K143. Inoltre, la lisina 79 dell'H3, la cui metilazione è una modifica altamente conservata che gioca un ruolo importante nel silenziamento dei telomeri nei sistemi non vegetali, non è modificata in *Arabidopsis*. Il pattern delle modifiche istoniche è dunque diverso in pianta. Le differenze tra vegetali ed animali

riguardano, oltre a determinati siti di modifiche istoniche unici nelle piante, anche classi di enzimi responsabili delle modifiche che sono specifici delle piante, ed, infine, distinte vie di regolazione delle loro attività.

Tra le modifiche istoniche, l'acetilazione e la metilazione sono quelle maggiormente caratterizzate finora e saranno trattate nei paragrafi successivi in maggiore dettaglio.

### 1.3.1 Acetilazione istonica ed analisi funzionale

L'acetilazione e la deacetilazione istonica sono importanti per la crescita, lo sviluppo, la difesa e l'adattamento. Ciascun nucleosoma ha più di 20 possibili target per l'acetilazione (Hollender and Liu, 2008). Inizialmente furono identificati come siti di questa modifica le lisine 9, 14, 18 e 23 dell'H3 e le lisine 5, 8, 12, 16 e 20 dell'H4 (Fuchs *et al.*, 2006).

L'acetilazione istonica è effettuata da una classe di enzimi noti come Acetiltrasferasi istoniche (HAT), che catalizzano il trasferimento di un gruppo acetilico dall'acetil-CoA ai gruppi amminici ε delle lisine sulle code N-terminali degli istoni. Questa modifica è reversibile ad opera delle Deacetilasi istoniche (HDAC). Studi in cellule animali hanno dimostrato che le HAT/HDAC possono modificare, oltre gli istoni, anche proteine regolatrici non istoniche e proteine strutturali (Loidl, 2004).

Le HAT e le HDAC ricoprono funzioni fondamentalmente simili in tutti gli eucarioti. Infatti, sono ben conservate nei loro domini catalitici e reclutano proteine con funzioni omologhe nelle diverse specie (Pandey *et al.*, 2002). Tramite analisi di sequenza sono state identificate 4 famiglie per le HAT e 3 per le HDAC (Tabella 1).

**Tabella 1:** Geni codificanti per gli omologhi HAT e HDAC in Arabidopsis.

Famiglia	Gene	Locus	Clone BAC	Cromosoma
RPD3/HDA1	HDA2	At5g26040	T1N24.9	V
	HDA5	At5g61060	MAF19.7	V
	HDA6 ( <i>AtRPD3B</i> )	At5g63110	MDC12.7	V
	HDA7	At5g35600	K2K18.5	V
	HDA8	At1g08460	T27G7.7	I
	HDA9	At3g44680	T18B22.80	III
	HDA10 <sup>a</sup>	At3g44660	T18B22.60	III
	HDA14	At4g33470	F17M5.230	IV
	HDA15	At3g18520	MYF24.23	III
	HDA17 <sup>a</sup>	At3g44490	F14L.2	III
	HDA18	At5g61070	MAF19.8	V
	HDA19 ( <i>AtRPD3A</i> )	At4g38130	F20D10.250	IV
	HDT1 ( <i>AtHD2A</i> )	At3g44750	T32N15.8	III
HD2	HDT2 ( <i>AtHD2B</i> )	At5g22650	MDJ22.7	V
	HDT3	At5g03740	F17C15.160/MED24.1	V
	HDT4	At2g27840	F15K20.6	II
	SRT1	At5g55760	MDP20.20	V
SIR2	SRT2	At5g09230	T5E8.30	V
GNAT	HAG1 ( <i>atGCN5</i> )	At3g54610	T14E10.180	III
	HAG2	At5g56740	MIK19.19	V
	HAG3	At5g50320	MXI2.23	V
MYST	HAG4	At5g64610	MUB3.13	V
	HAG5	At5g09740	F17I14.70/MTH16.20	V
CBP	HAC1	At1g79000	YUP8H12R.3	I
	HAC2	At1g67220	8 F1N21.4	I
	HAC4	At1g55970	F14J16.27/T6H22.23	I
	HAC5	At3g12980	MGH6.9	III
	HAC12	At1g16710	F17F16.21	I
TAF <sub>II</sub> 250	HAF1	At1g32750	F6N18.20	I
	HAF2	At3g19040	K13E13.16	III

Modificata da Pandey *et al.* (2002)

Le HAT comprendono la famiglia **GNAT-MYST**, i cui membri possiedono motivi di sequenza in comune con enzimi che acetilano proteine non istoniche e altre piccole molecole; la famiglia **p300/CBP**, che negli animali comprende coattivatori implicati nella regolazione dei geni coinvolti nel controllo del ciclo cellulare, differenziazione ed



apoptosi; la famiglia correlata a **TAFII250**, che è un cofattore presente nel complesso del fattore trascrizionale TFIID nei mammiferi; ed, infine, una quarta famiglia, non presente in pianta e funghi, che comprende coattivatori dei recettori nucleari.

Il gruppo più numeroso delle HDAC include: la superfamiglia **RPD3/HDA1**, presente in tutti gli eucarioti; la famiglia **SIR2**, i cui membri richiedono il NAD<sup>+</sup> (Nicotinammide Adenina Dinucleotide) come cofattore e non hanno similarità strutturale con le altre HDAC; infine, la famiglia **HD2**, presente solo in pianta, che comprende proteine omologhe alla classe delle *cis-trans* prolina isomerasi, presenti negli altri eucarioti.

Grazie al confronto con sequenze note di HDAC ed HAT, in *Arabidopsis* sono state identificate complessivamente 18 putative HDAC e 12 putative HAT (Pandey *et al.*, 2002). Tra quest'ultime, GCN5 è un membro ben caratterizzato della famiglia GNAT-MYST che esibisce attività HAT *in vitro* (Stockinger *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2003). In lievito, la proteina GCN5 è un componente di diversi complessi proteici, come ADA e SAGA (Grant *et al.*, 1999), ed in ciascun complesso essa coopera con altre subunità, come ADA2 ed ADA3, per stimolare l'attivazione trascrizionale (Balasubramanian *et al.*, 2002). Allo stesso modo, l'omologo di *Arabidopsis*, AtGCN5, sembra interagire con ADA2 ed ADA3, omologhe agli adattatori trascrizionali di lievito (Stockinger *et al.*, 2001; Mao *et al.*, 2006). Anche gli omologhi di mais, ZmGCN5 e ZmADA2, interagiscono sia *in vivo* che *in vitro* (Stockinger *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2004). Gli omologhi in pianta di GCN5 sono coinvolti nella risposta a stress e nello sviluppo. Infatti, AtGCN5 ed ADA2 interagiscono col fattore di trascrizione CBF1, che è responsabile dell'espressione dei geni indotti da freddo. Mutazioni in uno dei due geni inducono vari difetti che includono nanismo, sviluppo aberrante delle radici, petali e stami corti e ridotta espressione dei geni regolati dal freddo durante l'acclimatazione a basse temperature (Vlachonasios *et al.*, 2003). AtGCN5 acetila non solo gli istoni nel citoplasma e nel nucleo, ma anche le proteine ADA2, a siti unici per le proteine vegetali e non presenti negli omologhi di animali o di fungo (Mao *et al.*, 2006), suggerendo un nuovo ruolo delle HAT nell'autoregolazione dei complessi di acetilazione istonica in pianta. Studi recenti hanno suggerito una varietà di ruoli per GCN5 durante lo sviluppo delle piante (Bertrand *et al.*, 2003; Long *et al.*, 2006). Mutazioni in AtGCN5 influenzano l'espressione spaziale dei geni regolati dai fattori di trascrizione *WUSCHEL* (*WUS*) ed *AGAMOUS* (*AG*) a livello dei meristemi radicale e fiorale (Laux *et al.*, 1996). I mutanti producono fiori terminali e trasformazione omeotica degli organi fiorali (Bertrand *et al.*, 2003). AtGCN5 è stato anche isolato in uno screening per la soppressione della mutazione *topless-1* (*tp1-1*), che trasforma il polo apicale in un secondo polo radicale durante l'embriogenesi (Long *et al.*, 2006). Infine, mutazioni di AtGCN5 nel mutante *tp1-1* correggono l'espressione di *WUS*, ripristinando così un'appropriata differenziazione del polo apicale (Long *et al.*, 2006). Tuttavia non è chiaro se *WUS* sia un bersaglio diretto di AtGCN5 che potrebbe reprimere indirettamente la trascrizione di *WUS* attraverso l'attivazione del suo repressore o reclutare direttamente il repressore al suo promotore.

In *Arabidopsis*, la famiglia **MYST** comprende due proteine strettamente correlate, AtHAG4 (HAM1) ed AtHAG5 (HAM2), che *in vitro* mostrano attività HAT specifica per la lisina 5 dell'H4 (Early *et al.*, 2007) e sono espresse soprattutto negli organi in crescita come germogli e gemme fiorali (Latrasse *et al.*, 2008). Analisi genetiche hanno dimostrato che HAG4 ed HAG5 sono funzionalmente ridondanti, poiché i singoli mutanti *ham1* ed *ham2* non mostrano alcun fenotipo, mentre i doppi mutanti *ham1/ham2* non sono vitali. I mutanti *Ham1/ham1*; *ham2/ham2* e *ham1/ham1*; *Ham2/ham2* mostrano consistenti anomalie nella formazione dei gametofiti maschili e femminili a causa di un arresto del ciclo cellulare mitotico agli stadi precoci della gametogenesi (Latrasse *et al.*, 2008).

AtHAC1 appartiene alla famiglia delle “CREB-binding proteins”, **p300/CBP**, le cui funzioni sono ben caratterizzate negli animali. Le HAT di questa famiglia partecipano a molti processi fisiologici, inclusi la proliferazione, differenziazione ed apoptosi. Invece si sa poco circa il ruolo di AtHAC1 nel controllo dello sviluppo in *Arabidopsis*. Mutazioni in *AtHAC1* causano diversi difetti, tra i quali la fioritura tardiva. Le analisi hanno mostrato che i mutanti rispondono normalmente alla lunghezza del giorno, ai trattamenti con GA e vernalizzazione, mentre mostrano un incremento nei livelli di espressione del repressore della fioritura FLOWERING LOCUS C (FLC), indicando che il fenotipo di fioritura tardiva è mediato da *FLC*. Le modifiche istoniche di *FLC*, però, non sono influenzate da mutazioni in *AtHAC1*, per cui è stato proposto che AtHAC1 possa modificare l’acetilazione istonica a livello di un altro fattore a monte di *FLC* (Deng *et al.*, 2007). Oltre alla fioritura tardiva, i mutanti *Athac1* mostrano difetti di sviluppo come la formazione di radici primarie ridotte e fertilità parzialmente ridotta. Questi effetti possono essere causati dalla riduzione di acetilazione a livello di vari geni bersaglio.

Il genoma di *Arabidopsis* codifica per altri 4 omologhi delle proteine p300/CPB, mentre il numero negli animali è di uno o due (Pandey *et al.*, 2002). AtHAC1, AtHAC4, AtHAC5 ed AtHAC12 potrebbero essere funzionalmente ridondanti, cosa che spiegherebbe il motivo per cui le mutazioni di queste proteine causano fenotipi più forti in topo ed uomo rispetto ai mutanti *Athac1*. Questa ipotesi è supportata anche da un recente studio, nel quale la fioritura era maggiormente tardiva nei doppi mutanti *hac1/hac5* e *hac1/hac12* (Han *et al.*, 2007). Inoltre, la dimensione delle piante nei doppi mutanti risulta minore di quella del wild type, soprattutto negli stadi giovanili. Infine i doppi mutanti *hac1/hac5* sviluppano cotiledoni arrotondati e foglie a rosetta che non si osservano nei doppi mutanti *hac1/hac12*, suggerendo che le diverse HAC hanno funzioni distinte in alcuni programmi di sviluppo, così come, negli animali, i geni *CPB* e *p300* non sono completamente ridondanti nelle loro funzioni, ma hanno anche ruoli distinti (Han *et al.*, 2007).

HAF2, appartiene, insieme a HAF1, alla famiglia correlata a **TAFII250**. Mutazioni in HAF2 inducono una diminuzione dell’accumulo di clorofilla e dei livelli trascrizionali dei geni indotti dalla luce; analisi genetiche hanno dimostrato che *HAF2* è coinvolto nei pathway di segnale della luce sia nello spettro del rosso/rosso lontano, che del blu. I mutanti *haf2* mostrano una riduzione dei livelli di acetilazione dell’H3 nei promotori dei geni che rispondono alla luce, indicando che *HAF2* funziona come coattivatore specifico capace di integrare i segnali luminosi e l’acetilazione istonica per attivare la trascrizione dei geni indotti dalla luce (Bertrand *et al.*, 2005).

Tra le tre famiglie delle deacetilasi istoniche (HDAC), la superfamiglia **RPD3/HDA1** è quella maggiormente studiata. La deacetilasi istonica RPD3 è stata la prima identificata come regolatore della trascrizione di un subset di geni in lievito (Vidal and Gaber, 1991). Il legame tra deacetilazione istonica e repressione trascrizionale è stato però stabilito quando un omologo di RPD3 in mammifero, HD1, ha mostrato attività deacetilasica (Taunton *et al.*, 1996).

In *Arabidopsis*, AtHDA19 ed AtHDA6 sono le deacetilasi istoniche RPD3-like meglio caratterizzate, ed esse esibiscono sia funzioni simili che divergenti. *AtHDA19* (*AtHD1* o *AtRPD3A*) è espresso in tutti i tessuti durante il ciclo vitale della pianta, con alti livelli di espressione nei tessuti riproduttivi (Wu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2005). Si accumula prevalentemente nel nucleo, presumibilmente nelle regioni eucromatiche ed è escluso dal nucleolo (Fong *et al.*, 2006). La riduzione di espressione del gene *AtHDA19* risulta nell’accumulo di istoni H3 ed H4 iperacetilati (Tian and Chen, 2001; Tian *et al.*, 2003; 2005), mentre l’overespressione dello stesso riduce la quantità di istone H3 tetra-acetilato (Zhou *et al.*, 2005). Molte anomalie sono state osservate durante lo sviluppo dei mutanti *Athda19*. Essi risultano più bassi di statura, hanno

fiori con un ridotto numero di petali e stami più corti, la fertilità maschile e quella femminile sono ridotte, le silique sono più piccole e spesso contengono semi abortiti. Linee mutanti *Athda19* mostrano un fioritura leggermente ritardata in condizioni di giorno lungo (Tian *et al.*, 2003). Alcuni mutanti mostrano morte prematura delle piantine e sviluppo anomalo delle foglie. Il fenotipo del mutante inserzionale *hda19-1* è influenzato dalla temperatura. Alla temperatura di 29°C le piantine sviluppano meristemi apicali e radicali disorganizzati con un fenotipo che ricorda quello dei mutanti *tpl* (Long *et al.*, 2006). Lo studio dei mutanti ottenuti mediante RNAi, T-DNA e overespressione, ha fortemente supportato l'idea che *AtHDA19* sia un regolatore globale dell'espressione genica nello sviluppo e nella risposta a stress (Tian and Chen, 2001; Tian *et al.*, 2003; 2005; Zhou *et al.*, 2005). L'analisi del trascrittoma ha infatti dimostrato che, nel mutante inserzionale *hda19*, il 7% dei geni coinvolti in vari processi cellulari risulta differenzialmente regolato rispetto al wild type (Tian *et al.*, 2005). In particolare, Zhou *et al.* (2010) hanno mostrato che nei mutanti *Athda19*, allo stadio di plantula, era fortemente incrementato il livello di acetilazione dell'H3K9 e di espressione di alcuni geni analizzati. Poiché l'acetilazione dell'H3K9 è un marker riconosciuto dell'attivazione trascrizionale, il fatto che *AtHDA19* sia responsabile della rimozione di questa modifica, assegna a questa deacetilasi un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica, soprattutto nella risposta all'ambiente. Al contrario dei mutanti *Atgcn5*, che mostrano un fenotipo con allungamento dell'ipocotile e ridotta espressione dei geni luce-inducibili, i mutanti *Athda19* mostrano effetti opposti. Esperimenti di immunoprecipitazione della cromatina indicano che *AtHDA19* lavora in modo antagonistico rispetto a *AtGCN5* nel regolare i processi mediati dalla luce. Infatti i mutanti *Atgcn5* esibiscono una ridotta acetilazione istonica nelle regioni dei promotori dei geni luce-inducibili CAB2, RBCS-1A ed IAA. I mutanti *Athda19*, al contrario, esibiscono un aumento dell'acetilazione istonica sui promotori degli stessi geni (Benhamed *et al.*, 2006).

Esperimenti recenti (Tanaka *et al.*, 2008) indicano un ruolo di *AtHDA19* nella repressione, dopo la germinazione, dei geni correlati all'embriogenesi. Infatti si osservano anomalie nelle piantine mutanti, che potrebbero derivare dall'espressione ectopica di geni normalmente silenziati nelle piantine, come i geni correlati all'embriogenesi LEAFY COTYLEDON1 (LEC1) e FUSCA3 (FUS3), come pure l'espressione precoce del gene fiore-specifico SUPERMAN (SUP) e NO APICAL MERISTEM (NAM) (Tian and Chen, 2001; Tian *et al.*, 2003). La deacetilasi *AtHDA19*, infine, è coinvolta nella risposta a patogeni e a stress ambientali. I trascritti *AtHDA19* aumentano in seguito a ferite, infezioni da patogeni, e all'accumulo degli ormoni vegetali ed etilene in seguito alle infezioni di patogeni (Zhou *et al.*, 2005). In riso, l'overespressione dell'omologo di *HDA19*, *OsHDAC1-3*, comporta un incremento del tasso di crescita ed un'architettura alterata della pianta (Jang *et al.*, 2003).

In *Arabidopsis*, *AtHDA6* (*AtRPD3B*) è una deacetilasi con omologia di sequenza rispetto a *AtHDA19* (Wu *et al.*, 2000; Murfett *et al.*, 2001) ma, a differenza di quest'ultima, sembra esercitare azioni più specifiche. *AtHDA6* si esprime in vari tessuti, foglie, fiori, silique e plantule, ad un livello più basso rispetto ad *AtHDA19*, ed è coinvolta nel silenziamento dei transgeni, dei trasposoni e dei geni dell'RNA ribosomale (rRNA) (Murfett *et al.*, 2001; Aufsatz *et al.*, 2002; Lippman *et al.*, 2003; Lawrence *et al.*, 2004; Probst *et al.*, 2004). Al contrario dei mutanti *athda19*, i mutanti *athda6* non mostrano evidenti anomalie. *AtHDA6* si localizza principalmente nei nucleoli ed è richiesta per l'inattivazione dei NOR (Nucleolus Organization Region) ereditati da uno dei parentali negli ibridi interspecifici e negli allotetraploidi (Probst *et al.*, 2004; Early *et al.*, 2006): questo fenomeno, definito "dominanza nucleolare", è simile all'inattivazione del cromosoma X nei mammiferi. *AtHDA6* è stata rilevata

anche in altri siti nucleari, a supporto del ruolo nel silenziamento dei transgeni e degli elementi trasponibili (Murfett *et al.*, 2001; Aufsatz *et al.*, 2002; Lippman *et al.*, 2003; May *et al.*, 2005).

Data l'elevata similarità nei profili di espressione di *AtHDA6* ed *AtHDA19*, non sorprende che entrambe regolino, forse in maniera ridondante, processi come la mediazione dei pathway di segnale dell'acido jasmonico e dell'etilene, la promozione della fioritura e della senescenza, la soppressione del programma di sviluppo embrionale dopo la germinazione.

Altri membri della famiglia di deacetilasi **RPD3/HDA1** non sono ben caratterizzati. In particolare, *AtHDA18* sembra regolare i geni chiave nella differenziazione delle cellule dell'epidermide della radice (Xu *et al.*, 2005). L'espressione del gene *WER*, è diminuita nei mutanti, portando ad uno sviluppo di cellule dei peli radicali in posizioni anomale nella radice.

*AtHDA15* è unica tra le deacetilasi perché ha un motivo a dita di zinco (RanBP2-type zinc finger) che è conosciuto essere associato con il trasporto mediato da recettori tra nucleo e citoplasma. *AtHDA15*, come *AtHDA19*, *AtHD2A* e *AtHD2B*, è coinvolta nell'integrazione del T-DNA nelle trasformazioni mediate da *Agrobacterium*. Infatti, le linee RNAi *hda15* mostrano un fenotipo resistente alla trasformazione (Crane and Gelvin, 2007).

Le deacetilasi istoniche HD2-like rappresentano un gruppo di proteine specifico delle piante che non mostra similarità di sequenza con altre proteine HDAC (Pandey *et al.*, 2002). Esse perciò sono di particolare interesse poiché potrebbero essere coinvolte in funzioni peculiari per le piante. Alcuni membri di questa famiglia si localizzano nei nucleoli, mentre altri giocano un ruolo nello sviluppo dell'ovulo e dei semi, ma il ruolo specifico delle HD2 deve essere ancora definito. In *Arabidopsis* sono stati identificati 4 omologhi HD2 (Wu *et al.*, 2000; Dangl *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2003): *AtHD2A* (HDT1), *AtHD2B* (HDT2), *AtHD2C* (HDT3) e *AtHD2D* (HDT4). Le prime tre sono altamente espresse negli ovuli, embrioni, meristemi apicali del germoglio, foglie primarie e durante l'embriogenesi somatica, mentre *AtHD2D* è espressa in steli, fiori, e giovani silique, suggerendo che possa avere funzioni differenti (Zhou *et al.*, 2004). I mutanti che riducono o aumentano l'espressione di *AtHD2A* inducono l'aborto dei semi (Dangl *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2004). Inoltre alcuni geni coinvolti nello sviluppo e maturazione dei semi vengono repressi in linee overesprimenti questo gene. Anche un ortologo in *Solanum chacoense*, *Schd2A*, è fortemente indotto dopo la fertilizzazione dell'ovulo (Lagace *et al.*, 2003). Complessivamente questi dati suggeriscono un ruolo per *AtHD2A* durante lo sviluppo del seme. *AtHD2A* si localizza nel nucleolo ed è richiesta per la deacetilazione dell'H3K9 che si correla ad un conseguente incremento della metilazione dell'H3K4 nei NOR; ciò suggerisce che *AtHD2A* lavori con *AtHDA6* nel silenziamento dei geni rRNA soggetti a dominanza nucleolare (Early *et al.*, 2006). Infine, *AtHD2A* e *AtHD2B* sono importanti nel determinare la polarità delle foglie (Ueno *et al.*, 2007).

*AtHD2C* risulta coinvolta nelle risposte all'acido abscissico (ABA) (Sridha and Wu, 2006). Il fenotipo delle piante overesprimenti *AtHD2C* suggerisce un effetto indiretto di questo gene sull'espressione dei geni indotti da stress.

Per la famiglia SIR2, in *Arabidopsis* esistono due membri (Pandey *et al.*, 2002), ma le loro funzioni sono ancora da determinare. In lievito *Sir2* deacetila principalmente la lisina 16 dell'H4 e le lisine 56 e 9 dell'H3, in misura minore la lisina 14 dell'H3 (Imai *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007). Inoltre ha un'attività ADP-ribosiltrasferasica dipendente da NAD, che è una funzione distinta dalla sua attività di deacetilazione (Frye, 1999; Imai *et al.*, 2000). *Sir2* è coinvolta nel silenziamento dei telomeri, dell'rRNA e dei loci che regolano l'identità sessuale oltre che nella soppressione della ricombinazione

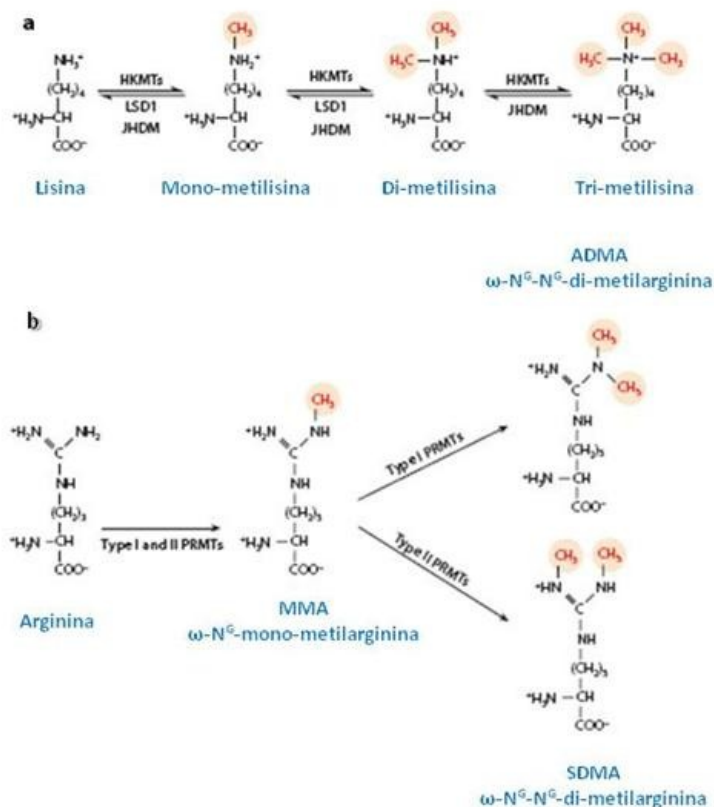
dell'rDNA (Rine and Herskowitz, 1987; Gottlieb and Esposito, 1989; Smith and Boeke, 1997; Imai *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007).

A differenza del lievito ci sono pochi dati sperimentali disponibili relativamente alle SIR2 in pianta. In *Arabidopsis* questa famiglia comprende due membri, SRT1 e SRT2. Il trattamento con inibitori (Grozinger *et al.*, 2001) determina un fenotipo simile a quello di mutanti compromessi nella risposta all'auxina (Przemeck *et al.*, 1996; Hardtke and Berleth, 1998) facendo ipotizzare un ruolo per SRT1 ed SRT2 nel pathway di segnale a questo ormone. In riso, linee RNAi per il gene *OsSRT1* mostrano una frammentazione del DNA e morte cellulare, accompagnata da un incremento nella produzione di perossido di idrogeno; questo fenotipo correla con un incremento dell'H3K9ac ed una riduzione dell'H3K9me2 nei trasposoni e nelle regioni dei geni coinvolti nella "hypersensitive response" (HR), suggerendo un ruolo per le SIR2 vegetali nella risposta HR (Huang *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Metilazione istonica ed analisi funzionale

La metilazione istonica si verifica sui residui di lisina o di arginina ed ha un ruolo importante in vari processi biologici, quali la formazione dell'eterocromatina, la regolazione del ciclo cellulare, il silenziamento e l'attivazione trascrizionale (Rea *et al.*, 2000; Kouzarides *et al.*, 2002; Sims III *et al.*, 2003; Springer *et al.*, 2003; Margueron *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2005; Volkel and Angrand, 2007). Gli enzimi responsabili di questa modifica sono le metiltrasferasi istoniche per la lisina (HKMT) e le metiltrasferasi per l'arginina (PRMT). La metilazione può essere rimossa dalle demetilasi istoniche (HDM) scoperte recentemente, che comprendono 2 gruppi: le demetilasi lisina-specifiche (LSD1) e le proteine contenenti il dominio Jumonji C (JmjC) (Liu *et al.*, 2010). Tramite la metilazione si può aggiungere più di un gruppo metilico: ciascuna lisina, infatti, può essere mono-, di- o tri-metilata [Fig 1B (a)] (Lachner and Jenuwein, 2002; Bannister and Kouzarides, 2004), mentre l'arginina può essere mono- o di-metilata, in maniera simmetrica o asimmetrica [Fig 1B (b)].

**Figura 1B:** Metilazione della lisina e dell'arginina



(a) La mono-, di- e tri-metilazione della lisina sono prodotte dalle istone lisina metiltrasferasi (HKMTs) e da 2 tipi di istone demetilasi: le lisina istone demetilasi 1 (LSD1) e le istone demetilasi contenenti il dominio JmjC (JHDMs). (b) La metilazione dell'arginina è prodotta dalle metiltrasferasi per l'arginina di tipo I e II (PRMTs). Modificata da Liu *et al.* (2010)

In *Arabidopsis*, la metilazione delle lisine finora riportata riguarda i residui K4, K9, K27 e K36 dell'H3. Come già anticipato nel paragrafo precedente, due importanti differenze rispetto al lievito e mammiferi riguardano l'H4K20, che, in pianta, è acetilata, anziché metilata, e l'H3K79 che non è metilata. Inoltre, *Arabidopsis* e riso hanno un livello più elevato di H3K4me2 rispetto a uomo e topo, e *Arabidopsis* ha livelli più bassi di H3K9me2 e H3K9me3 (Guo *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2004).

La metilazione delle lisine istoniche non altera la carica netta dei residui modificati ma eleva l'idrofobicità e può alterare le interazioni intra- e intermolecolari o creare nuove superfici di legame nei confronti di proteine che legano domini metilati. La metilazione caratterizza sia i domini cromatinici trascrizionalmente attivi che quelli silenziati, a seconda del residuo di lisina metilato e del numero di gruppi -CH<sub>3</sub>. Generalmente la metilazione di H3K9 e H3K27 è associata con regioni silenziate, mentre la metilazione dell'H3K4 e dell'H3K36 è associata a geni attivi (Berger, 2007). Tutte le HKMT contengono un dominio Su(var)3-9, E(Z), Trx (SET) tranne DOT1 in lievito. In base alle annotazioni del Pfam (Bateman *et al.*, 2004) e del ChromDB, i genomi di *Arabidopsis*, riso e mais codificano, rispettivamente, per 47, 37 e 35 proteine SET (Ng *et al.*, 2007). Una prima classificazione di queste proteine è stata fatta da Bambusch *et al.* (2001), che, sulla base dell'omologia con le proteine di *Drosophila*, classificarono 37 proteine SET di *Arabidopsis* suddividendole in 4 categorie omologhe a: **Suppression of variegation, Su(var)3-9**, comprendente sia proteine omologhe (SUVH) sia correlate (SUVR); **Enhancer of zeste, E(Z)**; **Trithorax (TRX)**, con proteine omologhe (ATX) e correlate (ATXR); **Absent, Small,**

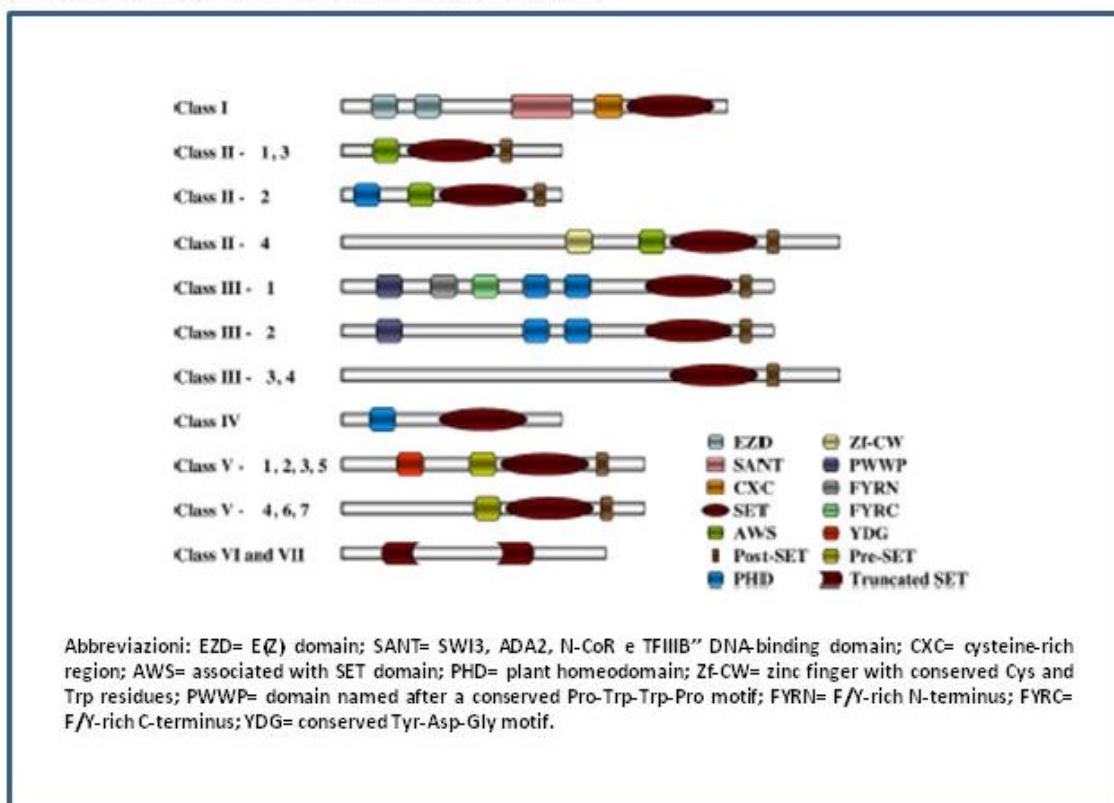
**or Homeotic discs 1 (ASH1)**, con proteine omologhe (ASHH) e correlate (ASHR) (Bambusch *et al.*, 2001; Chevillard *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). In seguito Springer *et al.* (2003) raggrupparono 32 proteine SET di *Arabidopsis* e 22 di mais in 5 classi in base alle loro relazioni filogenetiche ed all'organizzazione dei domini. Questa classificazione riflette fundamentalmente la specificità di substrato degli enzimi. La classificazione di Ng *et al.* (2007), infine, aggiunge altre 2 classi (VI e VII) rispetto a quella di Springer *et al.* (2003). Si riporta quest'ultima.

[illegible]

con l'illustrazione dell'organizzazione dei domini (Fig 2) dando di seguito i dettagli dell'analisi funzionale per ogni classe.



**Figura 2:** Architettura dei domini delle proteine SET in pianta



Modificata da Ng *et al.* (2007)

### 1.3.2.1 Classe I: omologhi di E(Z)

In *Drosophila*, le proteine E(Z) appartengono al gruppo delle proteine Polycomb (PcG), che regolano i geni omeotici durante l'embriogenesi via metilazione istonica (Schwartz and Pirrotta, 2007). Le proteine PcG formano complessi multiproteici: Polycomb Repressive Complex1 (PRC1) e PRC2, che include le proteine Enhancer of Zeste metiltrasferasi **[E(Z)]**, il soppressore di Zeste **[Su(z)12]**, Extra Sex Combs (**ESC**) e **p55**. PRC2 metila l'H3K27 e PRC1 si lega alle proteine istoniche metilate per mantenere lo stato represso (Lund and Lohuizen, 2004). I componenti di PRC2 sono conservati in piante e animali. In *Arabidopsis* MEDEA (**MEA**), CURLY LEAF (**CLF**) e SWINGER (**SWN**) sono i 3 omologhi di E(Z), mentre FERTILIZATION-INDIPENDENT ENDOSPERM (**FIE**) e 5 MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 **[(MSI)1-5]** sono omologhi di ESC e p55, rispettivamente (Goodrich *et al.*, 1997; Grossniklaus *et al.*, 1998; Kinoshita *et al.*, 1999; Henning *et al.*, 2003; Chanvivattana *et al.*, 2004). EMBRIONIC FLOWER2 (**EMF2**), FERTILIZATION-INDIPENDENT SEED2 (**FIS2**) e VERNALIZATION2 (**VIN2**) sono i 3 omologhi di Su(z)12 (Chaudhury *et al.*, 1997; Gendall *et al.*, 2001; Yoshida *et al.*, 2001). Sebbene CLF, MEA e SWN siano ritenuti H3K27me3 metiltrasferasi, non esistono ancora evidenze biochimiche della loro attività. In *Arabidopsis* esistono almeno 3 distinti complessi PRC2 che regolano geni coinvolti nella proliferazione cellulare, differenziazione e controllo dello sviluppo in risposta ai cambiamenti ambientali. Il complesso PRC2 costituito da MEA/FIS1, FIE/FIS3, FIS2 ed MSI1 è stato il primo identificato in *Arabidopsis*. Mutazioni in uno dei componenti di questo complesso comportano lo sviluppo dell'endosperma in assenza di fertilizzazione, suggerendo che sia richiesto per prevenire la proliferazione cellulare durante lo sviluppo del seme. MEA gioca un



ruolo anche nel mantenimento del suo stesso imprinting durante lo sviluppo dell'endosperma. Infatti, l'allele materno è espresso e rappresenta un componente essenziale del complesso PcG, che, a sua volta, mantiene il silenziamento dell'allele paterno (Jullien *et al.*, 2006).

Gli altri due complessi sono caratterizzati dalla stessa metiltrasferasi, CLF/SWN. CLF è stata la prima metilasi di questa classe identificata in pianta (Goodrich *et al.*, 1997). Il gene *SWN*, altamente simile a *CLF*, agisce in maniera ridondante nel mediare la metilazione dell'H3K27 (Schubert *et al.*, 2006; Chanvivattana *et al.*, 2004).

Di questi due complessi, uno, costituito da CLF/SWN, FIE, EMF2 e MSI1, impedisce la transizione fiorale reprimendo i geni omeotici fiorali come *AGAMOUS* (*AG*) e *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*) (Katz *et al.*, 2004; Schubert *et al.*, 2006) e permettendo così la crescita vegetativa (Yang *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1997; Goodrich *et al.*, 1997; Calonje and Sung, 2006; Schubert *et al.*, 2006). Mutazioni in *CLF* risultano in una fioritura precoce e fenotipi pleiotropici, incluse foglie "accartocciate" e parziale trasformazione omeotica di sepal e petali rispettivamente in carpelli e stami (Goodrich *et al.*, 1997; Schubert *et al.*, 2006). La derepressione trascrizionale di *AG* e del gene MADS-box *AGAMOUS-LIKE 19* (*AGL19*) nei mutanti *clf* potrebbe parzialmente spiegare i fenotipi anomali (Schonrock *et al.*, 2006). La modifica H3K27me3 risulta diminuita ai loci *AG* (Schubert *et al.*, 2006) ed *AGL19* (Schonrock *et al.*, 2006) nei mutanti *clf*. Poiché mutazioni missenso nel dominio SET di *CLF* risultano in un fenotipo simile a quello dell'allele nullo *clf* è possibile che CLF abbia un'attività metiltrasferasica *in vivo* e che l'attività enzimatica sia necessaria alla sua funzione biologica (Schubert *et al.*, 2006).

Mutanti *emf2* germinano producendo direttamente piccole infiorescenze sterili con un fiore terminale senza la crescita vegetativa; è possibile, quindi, che *EMF2* sia richiesto per la repressione della crescita riproduttiva precoce (Sung *et al.*, 1992). Consistentemente con questa idea, nei mutanti *emf2* i geni dell'identità degli organi fiorali, come *APETALA1* (*AP1*), *AP3*, *PISTILLATA* (*PI*) ed *AG* sono espressi ectopicamente (Moon *et al.*, 2003) e l'H3K27me3 al locus *AG* è notevolmente diminuita (Calonje *et al.*, 2008). Il terzo complesso PRC2 è costituito da un core formato dalle proteine VRN2, FIE, CLF/SWN e MSI1 più altre 3 proteine con dominio PHD (Plant Homeo Domain): VIN3, VRN5/VIL1 e VEL1/VIL2 (Chanvivattana *et al.*, 2004; De Lucia *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2006). Questo complesso è implicato nella vernalizzazione, un processo in cui la fioritura è promossa dall'esposizione al freddo. La vernalizzazione è uno degli esempi meglio caratterizzati di regolazione epigenetica indotta da segnali ambientali. Il tempo di fioritura dipende principalmente da 2 loci: *FRIGIDA* (*FRI*) ed *FLC* (Michael *et al.*, 1999; Sheldon *et al.*, 1999). *FRI* sopprime la fioritura aumentando l'espressione di *FLC* (Johanson *et al.*, 2000). La prolungata esposizione al freddo induce l'espressione di *VIN3*, che viene reclutato, insieme a VRN5/VIL1 e VEL1/VIL2, al locus *FLC* per formare il complesso PRC2 insieme ai 4 membri del core. Tale complesso media la tri-metilazione di H3K27 (De Lucia *et al.*, 2008; Sun and Zhou, 2008). *VIN3* è coinvolto anche nella deacetilazione del locus *FLC*, poiché nei mutanti *vin3* non si verificano cambiamenti nell'acetilazione in seguito a vernalizzazione (Sung and Amasino, 2004). Si ritiene che l'H3K27me3 recluti la proteina LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN (LHP1), che interagisce specificamente con questa modifica istonica per silenziare completamente *FLC* fino al ristabilirsi di temperature idonee (Gaudin *et al.*, 2001; Mylne *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2006; Turck *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Quando ciò si verifica, l'espressione di *VIN3* diminuisce leggermente, mentre il complesso PRC2 tramite H3K27me3 mantiene uno stato represso stabile del locus *FLC* (Bastow *et al.*, 2004; De Lucia *et al.*, 2008; Finnegan and Dennis, 2007; Sung and Amasino, 2004; Sung *et al.*, 2006). Anche VRN1 si lega direttamente alla cromatina a livello di *FLC* e mantiene lo stato

silenziato, sebbene non sia ancora noto il suo ruolo biochimico (Levy *et al.*, 2002). VIN3, VRN2 e VRN1 sono coinvolti anche nella metilazione dell'H3K9 per il silenziamento di FLC (Bastow *et al.*, 2004; Sung and Amasino, 2004), ma non è chiaro quale metiltrasferasi istonica sia responsabile di questa metilazione, poiché i singoli mutanti nelle diverse putative H3K9 HKMT non compromettono la repressione di FLC in risposta alla vernalizzazione (Mylne *et al.*, 2006), possibilmente a causa della loro ridondanza funzionale.

SWN esibisce una parziale ridondanza funzionale con CLF e MEA. I mutanti *swn* non mostrano un fenotipo alterato, ma incrementano fortemente il fenotipo dei mutanti *clf* e *mea* nei doppi mutanti *clf/swn* e *mea/swn* (Chanvivattana *et al.*, 2004; Makarevich *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Inoltre, esperimenti di immunolocalizzazione indicano che nei doppi mutanti *clf/swn* non varia il livello di H3K27me1, ma quello di H3K27me2/3 che risulta ridotto nell'eucromatina, suggerendo il ruolo di questi 2 geni nella di- e trimetilazione dell'H3K27 a livello di eucromatina (Lindroth *et al.*, 2004).

A differenza delle ben caratterizzate proteine di *E(Z)* in *Arabidopsis*, si sa molto poco degli omologhi in riso. Il genoma di riso codifica per 2 omologhi: *OsCLF* e *OsiEZ1/OsSET1* (Luo *et al.*, 2009); quest'ultimo si localizza nel nucleo e l'overespressione del suo dominio SET in *Arabidopsis* altera lo sviluppo del germoglio negli stadi di sviluppo precoce (Liang *et al.*, 2003; Thakue *et al.*, 2003).

Questi studi forniscono ulteriori evidenze del fatto che le proteine SET del gruppo E(Z) siano principalmente associate con la metilazione dell'H3K27 (Springer *et al.*, 2003) e che la tri-metilazione dell'H3K27 è presente in specifici loci repressi a differenti stadi di sviluppo delle piante.

#### 1.3.2.2 Classe II: omologhi di ASH1

Tutti i membri di questa classe hanno un dominio SET che è preceduto da un "dominio associato con SET" (AWS) ed è seguito da un dominio post-SET ricco di cisteina. Springer *et al.* (2003) riportano un'ulteriore suddivisione di questa classe in diversi gruppi sulla base della posizione del dominio SET. Nei mammiferi e in *Drosophila* la metiltrasferasi istonica ASH1 metila specificamente l'H3K36, che nella sua forma di- e tri-metilata è associata all'elongazione della trascrizione (Berger, 2007; Li *et al.*, 2007). Il genoma di *Arabidopsis* codifica per almeno 4 proteine omologhe (ASHH) ad ASH1 e 3 correlate (ASHR) (Baumbusch *et al.*, 2001). Tra queste, l'attività metiltrasferasica di SDG8 (ASHH2), SDG26 (ASHH1) e SDG4 (ASHR3) è stata dimostrata *in vitro* o *in vivo* (Cartagena *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005). SDG8 è necessaria per la di- e tri-metilazione di H3K36 a livello globale (Dong *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008). Mutazioni in SDG8 e SDG26 causano fenotipi di fioritura precoce e tardiva, rispettivamente (Xu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005). SDG8 determinando H3K36me2/3 attiva l'espressione dei geni *FLC* e *MADS AFFECTING FLOWERING* (*MAF*), mentre SDG26 reprime lo stesso gruppo di geni, presumibilmente in maniera indiretta (Xu *et al.*, 2008).

*SDG4* codifica per una proteina correlata ad ASH1 altamente espressa nel polline. Nel polline dei mutanti *sdg4* i livelli di H3K4me2 ed H3K36me3 sono fortemente ridotti nel nucleo vegetativo e la lunghezza del tubetto pollinico è ridotta, indicando un ruolo di *SDG4* nel controllo della crescita del tubetto, possibilmente regolando la metilazione di alcuni geni specifici del polline (Cartagena *et al.*, 2008).

Sebbene stia emergendo il ruolo della metilazione dell'H3K36 in *Arabidopsis*, non è chiaro se il suo meccanismo d'azione nella regolazione della trascrizione sia simile tra i differenti organismi. In animali e in lievito, l'H3K36me2/3 funge da sito di aggancio, durante l'elongazione trascrizionale, per reclutare altri enzimi responsabili delle modifiche istoniche, come HAT/HDAC, e consentire una regolazione della

trascrizione (Li *et al.*, 2007). In *C. elegans* l'H3K36me3 marca diversamente introni ed esoni dei geni trascritti, fornendo così l'informazione epigenetica nei processi di "splicing" (Kolasinska-Zwierz *et al.*, 2009).

### 1.3.2.3 Classe III: omologhi di Trithorax

Le proteine del gruppo Trithorax (TrxG) mediano la metilazione dell'H3K4 ed agiscono in maniera antagonista rispetto alle PcG. Le funzioni di TrxG e PcG sono conservate in piante e animali, dove generalmente le proteine PcG sono richieste per il mantenimento dello stato represso, mentre le Trx di quello attivo (Avramova, 2009; Pien and Grossniklaus, 2007).

In *Drosophila* Trx funziona attraverso il complesso acetiltrasferasico (TAC1) nel mediare l'espressione dei geni omeotici (Petruk *et al.*, 2001) e la sua attività H3K4 metiltrasferasica è stata solo di recente dimostrata sperimentalmente (Smith *et al.*, 2004). Il suo omologo, Set1, è stato la prima metiltrasferasi identificata in lievito (Rogeev *et al.*, 2001) dove ha un ruolo importante per la crescita cellulare e per il silenziamento dell'rDNA (Briggs *et al.*, 2001). Come Trx, Set1 funziona all'interno di un complesso, COMPASS (Complex Proteins Associated with Set1). Contrariamente a Set1, che in lievito è l'unico enzima responsabile della metilazione dell'H3K4 (Bernstein *et al.*, 2002; Santos-Rosa *et al.*, 2002), gli enzimi Trithorax in piante e animali sono numerosi (Alvarez-Venegas and Avramova, 2005; Wysocka *et al.*, 2005; Ruthenberg *et al.*, 2007). Il genoma di *Arabidopsis* codifica per 5 omologhi di Trx e 7 proteine correlate. *ARABIDOPSIS TRITHORAX 1* (ATX1) in maniera simile a Trithorax nei sistemi animali, regola i geni omeotici di pianta che controllano la formazione e l'identità degli organi fiorali (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003). Mutazioni in ATX1 causano, oltre che anomalie negli organi fiorali, anche una fioritura precoce (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003; Pien *et al.*, 2008). Diversamente da CLF, che sopprime l'espressione del gene omeotico di fiore AG, ATX1 ne aumenta l'espressione (Alvarez-Venegas *et al.*, 2003; Saleh *et al.*, 2007).

Inoltre, ATX1 interagisce direttamente col promotore e col primo esone del locus *FLC* determinando la trimetilazione dell'H3K4 (Pien *et al.*, 2008). Consistentemente con questa idea, nei mutanti *atx1*, il livello di H3K4me3 è ridotto al locus *FLC*, ma non quello di H3K4me2 (Pien *et al.*, 2008).

ATX2 è un paralogo di ATX1 ed è responsabile della di-metilazione dell'H3K4, fornendo il primo esempio di una attività K4 di-metilasica separata da quella K4 trimetilasica (Saleh *et al.*, 2008b). Sebbene ATX1 ed ATX2 siano altamente simili a livello di sequenza, essi mostrano una ridondanza solo parziale, ed, in particolare, ATX2 ha un ruolo più limitato rispetto ad ATX1. È stato stimato, infatti, che nei mutanti *atx1* il 7% dei geni cambia espressione, consistentemente con il ruolo di questo gene a livello globale (Alvarez-Venegas *et al.*, 2006a), mentre lo 0,8% dei geni ha espressione alterata nei mutanti *atx2*.

La regolazione dei geni omeotici è solo una delle possibili funzioni delle proteine Trx. ATX1 è coinvolto anche nei meccanismi di risposta a malattia e nel "cell signalling". Infatti, come già anticipato, in aggiunta al dominio SET, questa classe di proteine possiede anche altri domini altamente conservati. Alvarez-Venegas *et al.* (2006) hanno mostrato che ATX1 interagisce, mediante il dominio PHD, con il fosfatidilinositolo 5-fosfato (PI5P), che è un messaggero secondario in diversi processi, come la risposta allo stress iperosmotico, il traffico delle membrane ed i riarrangiamenti del citoscheletro (Wang, 2004). Tale interazione è stata ritrovata anche negli animali (Gozani *et al.*, 2003), a supporto dell'idea che le proteine contenenti il dominio SET possano agire come trasduttori dei segnali cellulari.

I pattern di distribuzione genomica dell'H3K4 metilato risultano simili in riso ed *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2008; Lippman *et al.*, 200; Zhang *et al.*, 2009). H3K4me1/2/3 sono arricchiti nelle regioni geniche, ma sono assenti dai trasposoni. Su scala genomica, i livelli di H3K4me3, ma non quelli di H3K4me1/2, correlano positivamente con elevati livelli di trascrizione in riso e *Arabidopsis*. Infatti, l'H3K4me3 si trova solo sui geni attivi (Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009), mentre l'H3K4me1/2 si trova sia su geni attivi che inattivi. In particolare, in *Arabidopsis*, l'H3K4me2 marca le regioni codificanti, indipendentemente dal fatto che esse siano trascrizionalmente attive, ed è assente dalle regioni intergeniche, suggerendo che l'H3K4me2 sia un marker generale per distinguere le regioni trascritte da quelle non trascritte (Alvarez-Venegas and Avramova, 2005). Inoltre, mentre la mono-metilazione dell'H3K4 è arricchita nelle regioni ORF dei geni, preferibilmente al 3' in *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2009), l'H3K4me2/3 è presente nei promotori e all'estremità 5' delle regioni trascritte sia in *Arabidopsis* che in riso (Li *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

#### 1.3.2.4 Classe IV: proteine con un dominio SET ed un dominio PHD

Questa classe di proteine è caratterizzata dalla presenza di un dominio PHD e di un dominio SET all'estremità C-terminale (Fig 2). ATXR5 ed ATXR6 sono gli unici enzimi caratterizzati biochimicamente che effettuano la mono-metilazione dell'H3K27 in *Arabidopsis* (Jacob *et al.*, 2009). I doppi mutanti *atxr5/atxr6* mostrano una parziale de-condensazione dell'eterocromatina costitutiva, una riduzione dell'H3K27me1 ai cromocentri e riattivazione di alcuni geni silenziati. È interessante notare che H3K27me1 non influenza la metilazione del DNA o la distribuzione dell'H3K9me2, caratteristici dell'eterocromatina. Questi risultati suggeriscono che sia la H3K9me2, dipendente dalla metilazione del DNA, che la H3K27me1, indipendente dalla metilazione del DNA, controllano la formazione dell'eterocromatina costitutiva. Un altro studio, infine, suggerisce un ruolo di ATXR5 ed ATXR6 nella regolazione del ciclo cellulare e nella replicazione del DNA attraverso interazioni con l'"antigene nucleare di proliferazione cellulare" (PCNA) (Raynaud *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.5 Classe V: omologhi di Su(var)3-9

Questa ampia classe comprende proteine omologhe (SUVH) e correlate (SUVR) al soppressore della variegazione Su(var) di *Drosophila*, caratterizzate dalla presenza di un dominio pre-SET, un dominio SET ed un dominio post-SET (Fig 2). Nelle proteine SUVH è presente un ulteriore dominio conservato, YDG/SRA (Tyr-Asp-Gly motif), a monte del dominio pre-SET. I membri di questa classe sono ritenuti essere coinvolti nella formazione dell'eterocromatina mediata dalla metilazione dell'H3K9 (Schotta *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002).

In *Arabidopsis*, SUVH4 o KRYPTONITE (KYP) è il membro meglio caratterizzato. A differenza di SU(VAR)3-9, KYP/SUVH4 può aggiungere 1 o 2, ma non 3 gruppi metilici sull'H3K9 *in vitro* (Jackson *et al.*, 2004). Nei nuclei dei mutanti *kyp/suvh4*, è fortemente ridotto l'accumulo di H3K9me2 nei foci di eterocromatina, ma non quello di H3K9me1, indicando che KYP/SUVH4 è la principale responsabile per la dimetilazione dell'H3K9. SUVH4 reprime l'espressione del gene omeotico florale *SUPERMAN* (*SUP*) e del gene *PHOSPHORIBOSYLANTHRANILATE ISOMERASE* (*PAI*) (Jackson *et al.*, 2002). Il silenziamento di *SUP* e *PAI* correla con la dimetilazione dell'H3K9 all'eterocromatina, che è associata con una forte metilazione del DNA (Baumbusch *et al.*, 2001; Lindroth *et al.*, 2001; Vaillant and Paszkowski, 2007). In *Arabidopsis* la metilazione del DNA può avvenire a tre siti differenti: CG, CHG o CHH, dove H può essere A, C o T. Nei mutanti *kyp/suvh4* la riduzione del

livello di H3K9me2 comporta una perdita di metilazione del DNA ai siti non-CG, dereprimendo così i geni silenziati *SUP* e *PAI* ed il trasposone endogeno *TA3* (Jackson *et al.*, 2002; Malagnac *et al.*, 2002). Questo dimostra anche che il mantenimento della metilazione del DNA ai siti non-CG richiede la dimetilazione dell'H3K9. Altre evidenze suggeriscono che la metilazione del DNA, a sua volta, dia supporto alla metilazione istonica. Ad esempio, il dominio YDG/SRA di KYP/SUVH4 e di SUVH6 lega preferenzialmente il DNA metilato su CHG (Johnson *et al.*, 2007). Una volta reclutati alle regioni bersaglio, i domini SET delle H3K9 metiltrasferasi metilano gli istoni adiacenti.

*SUVH5* e *SUVH6*, due omologhi di *KYP/SUVH4*, metilano l'H3K9 *in vitro* e sono parzialmente ridondanti con *KYP/SUVH4* (Ebbs *et al.*, 2005; 2006; Jackson *et al.*, 2004).

Altri due omologhi di *SU(VAR)3-9*, *SUVH2* e *SUVH9*, sono richiesti per la metilazione del DNA diretta dall'RNA (RdDM). Il dominio YDG/SRA di *SUVH2* lega preferibilmente i siti CG metilati, mentre quello di *SUVH9* quelli CHH metilati (Johnson, 2008).

Il coinvolgimento di questa classe di proteine nella formazione dell'eterocromatina è stato dimostrato anche per NtSET1 in tabacco (Shen, 2001) e confermato dall'evidenza che NtSET1 interagisce con LPH1 (omologo in *Arabidopsis* della proteina eterocromatina 1) (Yu *et al.*, 2004). Yu *et al.* (2004) hanno mostrato che NtSET1 possiede attività metilasica sia verso H3K9 che H3K27 *in vitro* e che la sua overespressione porta ad un incremento della di-metilazione di H3K9 nelle cellule di tabacco BY2.

Rispetto alle SUVH, tutte le SUVR perdono il dominio YDG. Tra esse, SUVR4, agisce come di-metiltrasferasi con preferenza per i substrati mono-metilati sull'H3K9. SUVR4, caratterizzato da un nuovo dominio, WIYLD, in posizione N-terminale si localizza preferibilmente nel nucleolo e nelle regioni nucleari non condensate, dove può funzionare come repressore dei geni dell'rDNA e/o dell'eucromatina (Thorstensen *et al.*, 2006). Per altri due omologhi, SUVR1 e SUVR2, non è stata rilevata attività metiltrasferasica (Thorstensen *et al.*, 2006).

#### 1.3.2.6 Classi VI e VII

Sia le proteine di classe VI che quelle di classe VII perdono diversi domini che caratterizzano le altre classi di proteine SET (Fig 2). Inoltre, il dominio SET risulta troncato o interrotto. Le proteine di classe VI in *Arabidopsis* includono 2 proteine correlate ad ASH (ASHR1 ed ASHR2) e 3 proteine correlate a Trx (ATXR1, ATXR2 ed ATXR4). Omologhi sono stati trovati sia in mais che in riso, suggerendo che questa classe di proteine si sia evoluta prima della separazione delle monocotiledoni dalle dicotiledoni. Brown *et al.* (2006) hanno riportato che l'omologo umano di ASHR1, Smyd2, limita la progressione del ciclo cellulare tramite la di-metilazione dell'H3K36. Sebbene non ancora stabilito in pianta, è probabile che, come il suo omologo in uomo, ASHR1 possa avere un'attività di metilazione dell'H3K36.

La classe VII, infine, comprende le proteine Rubisco Methyltrasferasi (RBCMT) ed altre proteine correlate a SET, le quali metilano proteine non istoniche.

Come l'acetilazione, anche la metilazione è regolata in maniera dinamica dalle demetilasi istoniche (HDM), enzimi in grado di rimuovere i gruppi metilici. Esistono 2 tipi di demetilasi che operano in base a diversi meccanismi di azione: l'ossidazione amminica e l'idrossilazione effettuate, rispettivamente, dalle demetilasi lisina-specifiche (LSD1) e da proteine contenenti il dominio Jumonji C (JmjC) (Shi *et al.*, 2004; Tsukada *et al.*, 2006). Questi due gruppi di proteine si legano a cofattori differenti ed agiscono su diversi substrati: le KDM1/LSD1 richiedono FAD (Flavine

Adenine Dinucleotide) come cofattore e la presenza di azoto protonato e, per tale motivo, agiscono solo su lisine mono- o di-metilate, mentre le JmjC usano il Fe(II) e l' $\alpha$ -ketoglutarato come cofattori per demetilare le lisine mono-, di- e tri-metilate (Klose and Zhang, 2007).

In *Arabidopsis* esistono 4 omologhi di KDM1/LSD1: FLOWERING LOCUS D (FLD), LDS1-LIKE 1 (LDL1), LDL2 ed LDL3. Tra essi, LDL1 demetila l'H3K4 mono- e di-metilato (Spedaletti *et al.*, 2008). FLD, LDL1 ed LDL2 hanno motivi conservati e sono tutti richiesti per reprimere l'espressione di FLC (He *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2007). In accordo con questa funzione, il livello di H3K4me2 risulta elevato al locus FLC nei mutanti *ldl1*, *ldl2* ed *fld* (Jiang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007).

*Arabidopsis* e riso contengono, rispettivamente, 21 e 20 proteine contenenti il dominio JmjC (JmJ) che sono raggruppate in 5 subfamiglie in base alla similarità di sequenza: KMD5/JARID1, KMD4/JHDM3, KDM3/JHDM2, JMJD6 e proteine contenenti solo il dominio JmjC (Lu *et al.*, 2008). Analisi funzionali e biochimiche sono ancora scarse nelle piante. Comunque, per la proteina MEE27/JMJ15 appartenente al gruppo KMD5/JARID1 è stato osservato che demetila l'H3K4 mono-, di- e trimetilato (Liu *et al.*, 2010). Analogamente è stato dimostrato che JMJD6 demetila H3K4 e regola il tempo di fioritura in *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2010). REF6/JMJ12 e ELF6/JMJ11 che appartengono al gruppo KMD4/JHDM3 hanno ruoli divergenti nel controllo del tempo di fioritura, poiché i mutanti *elf6/jmj11* hanno una fioritura precoce, mentre i mutanti *ref6/jmj12* mostrano un fenotipo di fioritura tardiva FLC-dipendente (Noh *et al.*, 2004). Uno studio recente ha anche mostrato una cooperazione tra le due proteine nel modulare i segnali da brassinosteroidi (Yu *et al.*, 2008). Esse vengono reclutate al sito bersaglio *BES1* e questa interazione coincide con la riduzione di H3K9me3 (Yu *et al.*, 2008). Tuttavia le loro proprietà biochimiche restano da chiarire. Anche la JMJD6 di riso appartiene a questo gruppo e demetila l'H3K9me3 sia *in vivo* che *in vitro* (Sun and Zhou, 2008). Mutazioni in questo gene portano a variazioni nel numero degli organi fiorali delle spighe e ad un aumento globale dell'H3K9me3/2 (Sun and Zhou, 2008).

In *Arabidopsis*, IBM1/JMJ25, omologo di KDM3/JHDM2 di uomo, come quest'ultimo è presumibilmente una demetilasi per H3K9me2 e H3K9me1 (Lu *et al.*, 2008; Saze *et al.*, 2008). In accordo con questa predizione, il fenotipo di *ibm1* può essere completamente soppresso dalle mutazioni di KYP/SUVH4 (Saze *et al.*, 2008). Tuttavia mancano ancora evidenze biochimiche relative all'attività demetilasiica sull'H3K9 da parte di IBM1/JMJ25 e di altre JmJ.

#### 1.4 Acetilazione e metilazione istonica in meiosi

Nel corso della meiosi, per gli eventi di appaiamento, sinapsi, ricombinazione e due successivi cicli di segregazione (Zickler and Kleckner, 1999) i cromosomi vanno incontro a riarrangiamenti dinamici continui che sono accompagnati dal reclutamento ed esclusione di complessi multiproteici, come quelli delle coesine, delle condensine, dell'SC. Le modifiche istoniche, altamente dinamiche e temporalmente coordinate con gli eventi specifici della meiosi, influenzano la struttura della cromatina e l'assemblaggio di questi complessi e tramite loro l'architettura dei cromosomi durante la meiosi.

Un evento essenziale della meiosi è rappresentato dalla ricombinazione, che, come descritto nel paragrafo 1.1, è necessaria per un'appropriata segregazione dei cromosomi nella maggior parte degli eucarioti (Hassold *et al.*, 2007). La ricombinazione inizia con i DSB che non sono distribuiti in modo casuale sui cromosomi. È stata osservata una correlazione tra i siti preferenziali di formazione dei DSB e le regioni della cromatina ipersensibili alle nucleasi (Borde *et al.*, 1999;

Fan and Petes, 1996; Mizuno *et al.*, 2001; Otha *et al.*, 2004; Wu and Lichten, 1994). In queste zone del genoma, definite “hot spot”, il tasso di ricombinazione è più elevato rispetto alle zone circostanti. Evidenze sempre più numerose suggeriscono che particolari modifiche post-traduzionali degli istoni contribuiscono alla definizione degli hot spot. Un mark epigenetico che, in lievito e nei mammiferi, definisce i siti di inizio di ricombinazione è rappresentato dalla trimetilazione dell'H3K4. In *S. cerevisiae* è stato osservato l'arricchimento per H3K4me3 ai siti di inizio della ricombinazione (Borde *et al.*, 2009). La mutazione nel gene *SET1*, che codifica per la metiltrasferasi istonica responsabile della metilazione su H3K4, riduce la formazione dei DSB all'84% dei siti, e la riduzione è quantitativamente correlata al livello di H3K4me3 nelle cellule. Attraverso diversi studi in uomo e topo è stata identificata una regione responsabile della distribuzione della ricombinazione nel genoma (Cheung *et al.*, 2010). Tale regione contiene il gene *PRDM9* che codifica per una proteina che trimetila l'H3K4 ed è espresso in maniera specifica nelle cellule germinali durante la profase I (Hayashi *et al.*, 2005). I mutanti di topo per *PRDM9*/MEISETZ sono sterili a causa di un notevole ritardo nella progressione meiotica allo stadio di pachitene. I meiociti mostrano forti alterazioni nella trimetilazione dell'H3K4, con difetti nel riparo dei DSB e nell'appaiamento degli omologhi (Hyashi *et al.*, 2005). Ceppi con diversi alleli al locus *PRDM9* mostrano diversi livelli di H3K4me3 considerando due hot spot, *Psmb9* ed *Hlx1*, nei quali un alto livello di metilazione correla con alti livelli di ricombinazione (Buard *et al.*, 2009). Altri mark epigenetici sono stati identificati come coinvolti nell'attività di singoli “hotspot”. In particolare, *HIS4* è uno dei più forti hotspot di ricombinazione in *S. cerevisiae* ed è associato con un'elevata frequenza di DSB localizzati a monte di *HIS4* (Fan and Petes, 1995; Nag and Petes, 1993). La metiltrasferasi istonica *SET2P* è coinvolta nella tri-metilazione dell'H3K36 ed agisce insieme alla deacetilasi istonica *RPD3* per inibire l'attività di questo hotspot. Infatti, la metilazione dell'H3K36, mediata da *SET2P*, è coinvolta nel reclutamento del complesso *RPD3* di tipo repressivo (Carrozza *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005). L'ipotesi è che questo complesso regoli negativamente la ricombinazione meiotica determinando una struttura chiusa della cromatina attraverso la deacetilazione. Merker *et al.* (2008), hanno osservato che, all'hotspot *HIS4*, il livello di acetilazione dell'H3K27 è elevato nei mutanti *set2*, *rpd3* e *set2/rpd3* vicino al sito dei DSB. Inoltre, anche mutazioni nel gene per la deacetilasi *HDA1* elevano significativamente l'attività di questo hot spot. Diversi altri lavori dimostrano che anche l'acetilazione istonica ha un ruolo importante nella ricombinazione. Ad esempio, il locus *ade6-M26* in *S. pombe* è tra gli “hotspot” meglio caratterizzati. L'allele *M26* deriva da una singola transversione G/T all'estremità 5' della regione codificante di *ade6* (Ponticelli *et al.*, 1988; Szankasi *et al.*, 1988). Questa mutazione conferisce un incremento del tasso di ricombinazione fino a 20 volte. È stato dimostrato che la cromatina a livello di *M26* ha una elevata sensibilità alla nucleasi micrococcica (MNase) all'inizio della meiosi (Mizuno *et al.*, 1997). Questa caratteristica della cromatina è fondamentale per l'attivazione dell'hotspot, e, diversi studi, hanno indicato che l'induzione è facilitata dall'acetiltrasferasi istonica *SpGCN5* e da un fattore di rimodellamento della cromatina, *SNF22*. Delezioni nei geni *SpGcn5* o *Snf22* risultano in perdita di attività dell'hotspot (Yamada *et al.*, 2004). In *S. cerevisiae*, *GCN5* è una HAT appartenente ad un complesso *ADA/SAGA* coinvolto nell'acetilazione dell'H3K9, H3K14, H3K18 ed H2B. Le mutazioni in questo gene conferiscono un arresto della meiosi a stadi molto precoci, prima della replicazione del DNA, impedendo la formazione di DSB. L'azione di *GCN5* sarebbe indiretta, attraverso l'attivazione trascrizionale, mediante acetilazione, di *IME2* che, a sua volta, attiva una serie di geni meiotici a valle (Burgess, 1999). Anche per *SIR2*, che in *S. cerevisiae* deacetila l'H4K16, è stato osservato un ruolo nella

ricombinazione. Mutazioni nel gene *sir2*, infatti, causano effetti sulla distribuzione dei DSB, elevando il numero dei DSB nel 5% dei geni e riducendolo nel 7% dei geni (Mieczkowski *et al.*, 2007). Invece la deacetilasi SIRT6, in uomo, è implicata nel riparo dei DSB, mediante legame con la proteina C-terminal interacting protein (CtIP) (Kaidi, 2010).

In *Arabidopsis*, infine, il gene *MCC1* che sembra determinare l'acetilazione dell'H3K9 e dell'H3K14 è coinvolto nella distribuzione dei "crossover" (CO). Il mutante overesprimente questo gene mostra riduzione della fertilità ed alterazioni nella micro- e macrosporogenesi. In particolare, la mutazione compromette il CO obbligato del cromosoma 2 determinandone l'8% di univalenti, riduce i CO sul cromosoma 1 ed incrementa i chiasmi sul cromosoma 4 (Perrella *et al.*, 2010).

Altre caratteristiche della cromatina sembrano, invece, essere associate con i "cold spot", regioni del genoma in cui la ricombinazione è soppressa, e tipicamente associate in lievito con i centromeri ed i telomeri (Gerton *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1996). In *S. pombe* la soppressione della ricombinazione avviene a livello dei loci dell'accoppiamento tramite un meccanismo che è dipendente da deacetilazione e metilazione istoniche (Huang, 2002).

Il controllo dell'appaiamento degli omologhi e la formazione dell'SC sono anch'essi processi meiotici essenziali (reviewed by Turner, 2007) in cui le modifiche istoniche giocano un ruolo importante. In *C. elegans*, l'H3K9me2 è associato con i cromosomi non appaiati nei nuclei in pachitene (Bean *et al.*, 2004; Kelly *et al.*, 2002; Reuben and Lin, 2002; Schaner and Kelly, 2006), e ciò suggerisce che questa modifica istonica sia collegata ad alterazioni nell'appaiamento. Inoltre, mutazioni nel gene per la metilasi istonica HIM17 portano ad una alterazione del pattern dell'H3K9me2 e a difetti nella formazione e nel riparo dei DSB, oltre ad anomalie nella segregazione dei cromosomi sessuali (Reddy and Villeneuve, 2004). Altri enzimi implicati nella metilazione dell'H3K9 hanno mostrato una funzione meiotica. G9a che è la principale H3K9me2/1 metiltrasferasi nei mammiferi si localizza nell'eucromatina e contribuisce al silenziamento trascrizionale (Ogawa *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2003; Gyory *et al.*, 2004; Nishio and Walsh, 2004; Roopra *et al.*, 2004). In topo è espressa durante gli stadi precoci della spermatogenesi. La delezione di G9a porta ad un drastico decremento dell'H3K9me2/1 durante la profase meiotica in entrambi i sessi causando completa sterilità maschile e parziale sterilità femminile. Gli spermatociti presentano difetti nella sinapsi oltre che nel riparo dei DSB con conseguente arresto in pachitene ed apoptosi (Tachibana *et al.*, 2007).

SUV39H, in topo, è coinvolta nella tri-metilazione dell'H3K9 a livello dell'eterocromatina pericentromerica (Peters, 2001). La mutazione ai due loci, *Suv39h1* e *Suv39h2*, determina un completo fallimento della spermatogenesi che dipende in gran parte dall'associazione non omologa dei cromosomi. Nei mutanti si osserva una pronunciata apoptosi durante la transizione da medio a tardo pachitene. Un'altra modifica dell'istone H3 su K27me3, in topo, compare all'inizio del pachitene, colocalizzando con l'SC: la sua inibizione determina alterazioni nella formazione dell'SC (Hernandez-Hernandez, 2010).

Tra le istone demetilasi, LSD1/KDM1 ha un'attività H3K9me1/2 demetilasi in uomo. In *S. pombe* (Lan *et al.*, 2007b; Opel *et al.*, 2007) la perdita di uno dei 2 omologhi, *splsd1* ed *splsd2*, risulta in difetti di sporulazione (Lan *et al.*, 2007b); entrambi gli omologhi sono anche importanti per il mantenimento dell'eterocromatina soprattutto a livello delle regioni contigue all'eucromatina (Gordon *et al.*, 2007; Lan *et al.*, 2007b).

L'importanza di una corretta attività di metilazione e de-metilazione istonica durante la meiosi è ulteriormente confermata dal fenotipo dei mutanti nulli per le demetilasi. In particolare, in topo, i mutanti per la demetilasi JHDM2A/KDM3A che effettua la



demetilazione dell'H3K9me2 (Okada *et al.*, 2007) sono vitali ma sterili, con severi difetti della spermatogenesi. I pochi meiociti presenti nei mutanti mostrano difetti nella condensazione della cromatina. È stato ipotizzato che questa demetilasi sia implicata nella condensazione della cromatina, attivando i geni coinvolti in questo processo, mediante demetilazione dei rispettivi promotori. Un'altra famiglia di demetilasi con funzione meiotica in topo è la JMJD2/KDM4 che presenta una dualità nella specificità del substrato. Essa, infatti, demetila l'H3K9me3/2 e l'H3K36me3/2. Nei mutanti *jmjd-2* la sinapsi e l'appaiamento sembrano normali, mentre le cellule germinali mostrano apoptosi e difetti nel riparo dei DSB (Whetstone *et al.*, 2006). Tra le demetilasi che agiscono sull'H3K4me, è stato osservato un ruolo per KDM5 nella meiosi di *S. cerevisiae* (Seward *et al.*, 2007), i cui mutanti mostrano difetti di sporulazione.

In *Drosophila*, i mutanti nulli per SU(VAR)3-3, che è una H3K4me2/1 demetilasi, esibiscono livelli elevati di metilazione e severi difetti di sterilità sia maschile sia femminile, con completa assenza di oociti nelle femmine (Rudolph *et al.*, 2007).

## 1.5 Scopi e contenuti della tesi

Il lavoro della presente tesi di dottorato si è svolto nell'ambito del progetto europeo "Systematic Analysis of Factors Controlling Meiotic Recombination in Higher Plants (MeioSys)". Lo scopo principale è stato quello di stabilire il ruolo in meiosi dell'acetilazione istonica in relazione, soprattutto, alla ricombinazione. Mediante strategie di "reverse genetics" è stata effettuata un'analisi sistematica di 31 geni codificanti per acetilasi/deacetilasi istoniche (HAT/HDAC) in *Arabidopsis thaliana*. Le linee che hanno evidenziato riduzione della fertilità della siliqua e quelle riguardanti geni che *in silico* erano risultati candidati ad avere un ruolo in meiosi sono state caratterizzate mediante analisi molecolari e della vitalità pollinica. Un gene codificante per la deacetilasi istonica HDA19, la cui inattivazione causa riduzione sia della produzione di semi che della fertilità pollinica, è risultato avere un ruolo meiotico nel controllo dei chiasmi e nella segregazione dei cromosomi. Allo scopo di determinare l'andamento dell'acetilazione istonica, oltre che della metilazione, durante la meiosi è stata effettuata l'immunolocalizzazione usando diversi anticorpi che riconoscono specifici residui di lisina (K) acetilati o metilati sugli istoni H3 ed H4 definendo un quadro di riferimento della dinamica di queste modifiche istoniche nella microsporogenesi di *Arabidopsis*.

## 2. MATERIALI E METODI

### 2.1 *Arabidopsis*: materiale e allevamento

Le linee presunte “knockout” per i geni HAT/HDAC sono state identificate dal “Sequence Indexed Library of Insertion Mutation” utilizzando l’*Arabidopsis* gene mapping tool (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). I semi delle linee SALK e CS e quelli degli ecotipi Columbia e Wassileskja, utilizzati come controlli, sono stati ottenuti dal Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) (<http://arabidopsis.info>). La semina e l’allevamento delle piante sono state effettuate secondo i protocolli descritti da Weigel and Glazebrook (2002). L’analisi visiva delle silique mature ha consentito la stima della fertilità.

### 2.2 Analisi molecolari

#### 2.2.1 Estrazione DNA e PCR

L’estrazione del DNA genomico dal tessuto fogliare è stata effettuata utilizzando il “DNAsi Plant Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo il protocollo descritto dalla casa produttrice.

Le reazioni PCR per la verifica dell’inserzione del T-DNA sono state allestite sul DNA genomico utilizzando protocolli standard (Sambrook and Russell, 2001) con i primer riportati nella tabella 3.

Nel caso delle linee SALK, i primer sono stati disegnati utilizzando il tool “iSct Primers” disponibile sul sito <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>, che fornisce le combinazioni di primer *forward* e *reverse* per analizzare le singole linee, in combinazione con un primer specifico per il T-DNA, LBb3.1. In particolare, per ciascuna linea analizzata, sono state allestite 2 reazioni PCR usando le seguenti combinazioni di primer:

primer gene Forward + primer gene Reverse

primer gene Forward + primer LBb3.1

Nel caso della linea CS 31355, dell’inserzione del T-DNA, che si trova nel secondo esone, non è nota la sua posizione precisa. Per questo motivo, i primer forward (HDA19 F) e reverse (HDA19 R) sono stati disegnati alla fine del primo e del secondo esone, rispettivamente, ed essi sono stati usati in combinazione con i primer per il T-DNA (T-DNA F e T-DNA R) riportati nel lavoro di Krysan *et al.* (1996) (Tab. 3) secondo il seguente schema:

HDA19 F + HDA19R

HDA19 F + T-DNA R

HDA19 F + T-DNA F

HDA19 R + T-DNA R

HDA19 R + T-DNA F

T-DNA F + T-DNA R

**Tabella 3:** Elenco dei primer utilizzati nelle reazioni PCR

<b>Nome del primer</b>	<b>Sequenza del primer</b>
S_007123 F	5' - TTCTTGTTGATGATTGGAGCC - 3'
S_007123 R	5' - TTGAAACCGTCCTCACAATC - 3'
S_119279 F	5' - GTCCAGCAAAGACTCACAAGC - 3'
S_119279 R	5' - CGTTTTAGGAATCTCTGCAG - 3'
S_086287 F	5' - AACCCACTTTATCAAATGGTTTC - 3'
S_086287 R	5' - ACTCTTCACGACCATCCAAAC - 3'
S_131994 F	5' - ATGATCCGGACATTGTGCTAG - 3'
S_131994 R	5' - ATCAGGTGATCTGAAGGCAAG - 3'
S_027726 F	5' - ATGGTGTGCGAATCTATGACC - 3'
S_027726 R	5' - ACGGAGAGGAAAGCTCAAGAC - 3'
S_045791 F	5' - TCTTCATGCGTCCCATAGTTC - 3'
S_045791 R	5' - CATGTGTGACTGATCAGGTGG - 3'
HDA19 F	5' - TATGCTGGAGGATCTGTTGGT - 3'
HDA19R	5' - TAATAAATCAAAGAAAGAGAGGCG - 3'
TDNAF	5' - GATGCACTCGAAATCAGCCAATTTAGAC - 3'
TDNAR	5' - TCCTCAATCGTTGCGGTTCTGTCAGTTC - 3'
LBb3.1	5' - TTGACCATCATACTCATTGTC - 3'

### 2.2.2 Analisi di espressione

L'RNA totale è stato estratto da tessuti fogliari e da bocci fiorali allo stadio 8-11 (Sanders *et al.*, 1999) utilizzando l'"RNAsi Plant Mini Kit" (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo il protocollo descritto dalla casa produttrice.

Per l'analisi semi-quantitativa RT-PCR è stato utilizzato il sistema "Superscript III™ Two-Step RT-PCR" (Invitrogen, CA, USA) ed i primer impiegati per l'amplificazione sono riportati nella tabella 4. Per la retrotrascrizione sono stati usati 380 ng di RNA totale ed OligodT 12-18 (Invitrogen, CA, USA). L'amplificazione è stata condotta utilizzando il gene APT (adenine phosphoribosyltransferase) come normalizzatore. In particolare, per il gene *HDA6* sono stati usati i primer (CS 24038 F/R) riportati nel lavoro di Wu *et al.* (2008). I prodotti delle reazioni RT-PCR sono stati separati su gel ad alta risoluzione al 2% di agarosio (Sambrook and Russell, 2001).

**Tabella 4:** Elenco dei primer utilizzati nell'analisi di espressione

<b>Nome del primer</b>	<b>Sequenza del primer</b>
HDA19 RT F	5' - GCCAAGGTCATCCCATGAA - 3'
HDA19 RT R	5' - CCGTGCTCAATCCTCTAAAACA - 3'
HDA7 RT F	5' - TATAACCTCCACCGCCACATG - 3'
HDA7 RT R	5' - ATACCACCGGCCAGTTTATG - 3'
CS24038 RT F	5' - TAGAGCCGGACAACAACTC - 3'
CS24038 RT R	5' - TTCACGTCTGGCTCTGGGTT - 3'
APT RT F	5' - TGTGCAAGATCCCAGAATCG - 3'
APT RT R	5' - TCCAACGAATACTCCTCCGAA - 3'

## **2.3 Analisi citologiche**

### **2.3.1 Analisi della microsporogenesi**

Per lo studio della meiosi maschile sono stati impiegati bocci fiorali allo stadio 8-11 (Sanders *et al.*, 1999) utilizzando il protocollo descritto in Armstrong *et al.* (2001).

### **2.3.2 Analisi della colorabilità pollinica**

Fiori delle linee salk e CS e dei controlli Col-0 e Ws sono stati utilizzati per saggiare la fertilità pollinica mediante il test di Alexander come descritto da Bonhomme *et al.* (EMBO COURSE, <http://www.isv.cnrs-gif.fr/embo99/manuals/pdf/ch1.pdf>).

### **2.3.3 Immunolocalizzazione**

Gli esperimenti di immunolocalizzazione su Col-0 sono stati condotti utilizzando sia anticorpi commerciali (Millipore, MA, USA) anti-H3K9K14ac, anti-H4K16ac, anti-H4K5ac, sia gli anticorpi sperimentali anti-H4K9ac e H3K4me3 prodotti e gentilmente forniti dal Dr. A. Viotti (CNR-IBBA, MI). È stato seguito il protocollo descritto in Armstrong *et al.* (2002) apportando alcune modifiche. Tra queste, la fissazione dei bocci fiorali è stata effettuata per 10-20 minuti in paraformaldeide fredda al 4%; dopo tre lavaggi in PBS, come descritto nella procedura, il materiale è stato incubato in una soluzione enzimatica di cytohelicase 0,4% per 2 ore a 37°C; i bocci sono stati successivamente dissezionati per far fuoriuscire le antere. Ulteriori modifiche hanno riguardato: l'ulteriore digestione enzimatica del materiale ottenuto e la sua fissazione sul vetrino con azoto liquido; saturazione dei siti di legame liberi con 1% BSA (Sigma, MO, USA) in PBS con 0,1% Triton X-100 per 20 minuti; incubazione a 4°C per 16-24 ore con anticorpo primario 1:250 nel caso dell'anticorpo anti-H3K9K14ac, 1:100 per i restanti anticorpi primari.

## **2.4 Analisi di germinabilità *in vitro***

Per verificare la presenza del gene di resistenza associato all'inserzione, i semi delle linee putative knock-out sono stati posti su mezzo selettivo (GM + Kanamicina 50mg/L) a confronto con mezzo non selettivo (GM).

## **2.5 Analisi statistiche**

La frequenza delle piante che presentavano il fenotipo di interesse è stata analizzata mediante il test  $\chi^2$ , per verificare i rapporti di segregazione.

### 3. RISULTATI

#### 3.1 Analisi sistematica dei geni HAT/HDAC

È stata effettuata un'analisi sistematica dei geni codificanti per le acetilasi/deacetilasi istoniche (HAT/HDAC) in *Arabidopsis* mediante strategie di "reverse genetics". Sulle linee presunte "knock-out", identificate per ciascun gene, è stato condotto uno screening per la semisterilità della siliqua. Sulle linee selezionate sono state eseguite ulteriori indagini basate su analisi fenotipiche, molecolari e citologiche e di seguito si riportano i risultati.

##### 3.1.1 Identificazione delle linee "knock-out"

L'analisi ha interessato complessivamente 31 geni di *Arabidopsis* (Tab. 5). Di questi, 30 erano stati identificati *in silico* da Pandey *et al.* (2002) come codificanti per 12 HAT e 18 HDAC. Le attività enzimatiche di acetilazione e deacetilazione istonica sono state successivamente confermate in modo sperimentale per alcune fra queste. Il gene rimanente *MCC1-like* mostra alta similarità con *MCC1*, gene isolato presso il nostro laboratorio e riportato in banca dati come codificante una HAT GCN5-like (Perrella *et al.*, 2010). Per procedere all'analisi funzionale di questi geni in meiosi, presso le collezioni pubbliche disponibili (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) sono state reperite le corrispondenti linee presunte "knockout", comprendenti sia mutanti inserzionali (T-DNA) sia linee RNA-i.

Nell'ambito dei mutanti inserzionali (SALK e CS 31355) la scelta delle linee si è basata sulla posizione dell'inserzione, privilegiando quelle in cui essa era contenuta negli esoni posti all'inizio o al centro dei geni. Quando non erano presenti inserzioni nell'ORF, sono state scelte le linee con l'inserzione negli introni, preferibilmente all'inizio o al centro dei geni. Laddove non erano disponibili i mutanti inserzionali sono state scelte linee RNA-i (linee CS) tra quelle riportate nei lavori pubblicati.

In tabella 5 sono elencate le 36 linee reperite, di cui 29 inserzionali e 7 linee RNA-i. Per 4 geni sono state analizzate più linee. Per le linee inserzionali è riportata in tabella 5 anche la posizione del T-DNA rispetto al gene interessato.

**Tabella 5:** Elenco delle 29 linee inserzionali selezionate (SALK e CS 31355) e delle 7 linee RNA-i (CS 24038, CS 24039, CS 30355, CS 3969, CS 30957, CS 3983, CS 30854). Per ciascun gene analizzato si riporta la famiglia di appartenenza, il locus, la linea e la posizione dell'inserzione all'interno del gene.

Enzima	Gene	Famiglia	Locus	Linea	Posizione T-DNA
DEACETILASI ISTONICHE	HDA2	RPD3/HDA1	At5g26040	SALK_041074	1° esone
	HDA5		At5g61060	SALK_004122	1° introne
	HDA6 (AtRPD3B)		At5g63110	CS 24038	—
				CS 24039	—
	HDA7		At5g35600	SALK_108050	5'UTR
				SALK_002912	5'UTR
	HDA8		At1g08460	CS 30955	—
	HDA9		At3g44680	SALK_007123	5° esone
	HDA10		At3g44660	SALK_119279	intergenica dopo 5'UTR
	HDA14		At4g33470	SALK_097005	4° introne
	HDA15		At3g18520	SALK_004027	2° esone
	HDA17		At3g44490	SALK_090088	3'UTR
	HDA18		At5g61070	SALK_006938	ultimo esone
				CS 31355	2° esone
	HDA19 (AtRPD3A/HDI)		At4g38130	SALK_139443	1° esone
				SALK_139445	1° esone
	HDT1 (AtHD2A)		HD2	At3g44750	CS 3969
	HDT2 (AtHD2B)	At5g22650		SALK_035452	intergenica prima di 5' UTR
	HDT3	At5g03740		SALK_129799	introne al 5'
	HDT4	At2g27840		CS 30957	—
	SRT1	SIR2	At5g55760	SALK_086287	5'UTR
	SRT2		At5g09230	SALK_131994	7° introne
	ACETILASI ISTONICHE	HAG1 (atCGN5)	GNAT	At3g54610	SALK_030913
HAG2		At5g56740		SALK_152796	2° introne
HAG3		At5g50320		CS 3983	—
MCC1-like		MYST	At5g16800	SALK_016406	1° introne
HAG4 (HAM1)			At5g64610	SALK_027726	1° esone
HAG5 (HAM2)			At5g09740	SALK_106046	2° introne
HAC1		CBP	At1g79000	SALK_080380	5° esone
HAC2			At1g67220	CS 30854	—
HAC4			At1g55970	SALK_045791	2° esone
HAC5		TAFII250	At3g12980	SALK_152684	2° esone
HAC12			At1g16710	SALK_052498	penultimo introne
HAF1			At1g32750	SALK_110848	penultimo esone
				SALK_116607	7° introne
HAF2			At3g19040	SALK_088103	10° introne

### *3.1.2 Screening fenotipico*

Lo screening fenotipico iniziale condotto su oltre 800 piante si è basato sulla presenza di semisterilità nella siliqua poiché alterazioni della meiosi sono generalmente correlate con riduzione della fertilità della siliqua. I controlli corrispondenti al background genetico delle linee sono rappresentati dall'ecotipo Columbia (Col-0), nel caso delle linee SALK, e da Wassileskja (WS) nel caso delle linee CS ed entrambi mostrano completa fertilità della siliqua. Per ciascuna linea è stato analizzato un numero di piante variabile tra 10 e 51 ed i risultati ottenuti sono riportati in tabella 6.

**Tabella 6:** Frequenza di piante semisterili osservate per ciascuna delle 36 linee analizzate.

<b>Linea</b>	<b>N. Piante analizzate</b>	<b>Piante semisterili (%)</b>
SALK_041074	19	0
SALK_004122	17	0
CS 24038	50	0
CS 24039	12	0
SALK_108050	29	0
SALK_002912	10	0
CS 30955	10	0
SALK_007123	20	40
SALK_119279	28	4
SALK_097005	38	0
SALK_004027	23	0
SALK_090088	18	0
SALK_006938	16	0
CS 31355	23	65
SALK_139443	18	0
SALK_139445	15	0
CS 3969	22	0
SALK_035452	30	0
SALK_129799	16	0
CS 30957	10	0
SALK_086287	27	4
SALK_131994	23	4
SALK_030913	29	0
SALK_152796	21	0
CS 3983	15	0
SALK_016406	51	0
SALK_027726	21	19
SALK_106046	24	0
SALK_080380	24	0
CS 30854	23	0
SALK_045791	11	18
SALK_152684	44	0
SALK_052498	10	0
SALK_110848	10	0
SALK_116607	24	0
SALK_088103	33	0
Col-0	24	0
WS	24	0

### *3.1.3 Analisi dei putativi mutanti*

Con frequenza diversa sono state osservate piante semisterili in 7 linee: SALK\_007123, SALK\_119279, SALK\_086287, SALK\_131994, SALK\_027726, SALK\_045791 e CS



31355. Per ciascuna di esse sono state selezionate 1-3 piante semisterili e sulle loro progenie sono state condotte in parallelo diversi tipi di analisi per confermare ed approfondire i risultati del primo screening fenotipico. I risultati relativi all'analisi fenotipica, citologica e molecolare delle progenie sono riportati nelle tabelle 7 e 8. Tra le analisi molecolari condotte, l'amplificazione del DNA con primer opportunamente disegnati ha consentito di verificare la presenza dell'inserzione nel locus atteso ed il suo stato di eterozigosi/omozigosi in piante scelte in maniera casuale nell'ambito delle progenie di 5 linee. La germinabilità *in vitro* ha consentito di selezionare su mezzo selettivo le piante con l'inserzione, grazie al marcatore di resistenza associato. In particolare, la linea SALK\_007123 ha mostrato un fenotipo di sterilità a livello della siliqua ed anomalie della fertilità pollinica. Contrariamente all'atteso, sia la mancata germinazione *in vitro* dei semi in presenza dell'antibiotico kanamicina, sia la verifica molecolare hanno evidenziato l'assenza dell'inserzione.

Nella linea SALK\_119279 l'analisi fenotipica non ha confermato la semisterilità della siliqua e nessuna alterazione della fertilità pollinica è stata osservata. Anche in questo caso, l'analisi PCR ha indicato l'assenza dell'inserzione, suggerendo che il fenotipo osservato nel primo screening fosse casuale.

Le tre linee SALK\_086287, SALK\_131994 e SALK\_045791 non hanno confermato la semisterilità osservata nel primo screening ed anche la fertilità pollinica è risultata regolare. L'analisi PCR ha indicato la presenza dell'inserzione.

La linea SALK\_027726 (*HAM1*) ha mostrato sterilità sia a livello di siliqua che di polline ed è risultata eterozigote per l'inserzione. In letteratura è riportato che i singoli mutanti nelle HAT HAM1 e HAM2 non hanno difetti di sterilità, mentre i doppi mutanti, ottenuti incrociando le linee SALK\_027726 e SALK\_106046 (*HAM2*) manifestano difetti nello sviluppo dei gametofiti maschile e femminile (Latrasse *et al.*, 2008). Per questo motivo è stata effettuata un'ulteriore PCR con i primer specifici per l'inserzione presente nella linea SALK\_106046; i risultati hanno indicato chiaramente che, nella linea SALK\_027726, era presente un'inserzione anche nel gene *HAM2* e che entrambe le inserzioni erano presenti in eterozigosi, indicando che il fenotipo dipendeva dalla presenza dell'inserzione in entrambi i geni.

**Tabella 7:** Analisi fenotipica e citologica effettuata sulle progenie delle piante semisterili selezionate nel primo screening. Per ciascuna linea si riporta il numero di progenie analizzate con il totale delle piante, la percentuale di piante semisterili e la fertilità pollinica.

Linea	N. progenie da piante semisterili	N. totale piante analizzate	N. piante semisterili (%)	Fertilità pollinica
SALK_007123	2	20	20	semisterile
SALK_119279	1	10	0	fertile
SALK_086287	1	31	0	fertile
SALK_131994	1	34	0	fertile
SALK_027726	3	30	47	semisterile
SALK_045791	2	20	0	fertile

**Tabella 8:** Analisi molecolare sui loci interessati dall'inserzione nelle progenie delle piante semisterili selezionate nel primo screening.

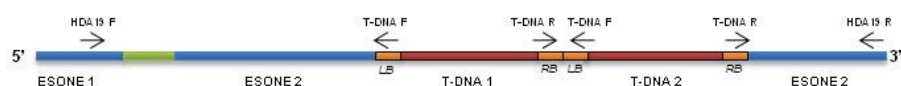
Linea	N. piante analizzate	Stato dell'inserzione
SALK_007123	2	NO T-DNA
SALK_119279	2	NO T-DNA
SALK_086287	1	OMOZIGOTE
SALK_131994	1	OMOZIGOTE
SALK_027726	1	ETEROZIGOTE
SALK_045791	2	OMOZIGOTE

### 3.1.4 Analisi funzionale del gene *HDA19*

La linea CS 31355, con l'inserzione a livello del gene *HDA19*, aveva evidenziato nel primo screening semisterilità della siliqua per il 65% delle piante (Tab. 6). L'analisi del  $\chi^2$  indica che tale risultato è consistente con l'ipotesi di un rapporto di segregazione 3:1 corrispondente ad una mutazione dominante ( $p < 0,05$ ). Con il test di Alexander per la verifica della fertilità pollinica è emerso che tutte le piante della linea CS 31355 che mostravano semisterilità della siliqua avevano anche una riduzione della fertilità pollinica del 41%.

L'analisi PCR, condotta mediante le combinazioni di primer illustrate nel paragrafo 2.2.1, ha fornito i risultati riportati in tabella 9, suggerendo che l'inserzione fosse presente in 2 copie successive, secondo lo schema riportato nella figura 3.

**Figura 3:** Schema rappresentativo della localizzazione di due copie del T-DNA nel secondo esone del gene *HDA19*. Per ciascuno dei primer utilizzati sono riportate le posizioni di *annealing*. I primer per il T-DNA (Krysan *et al.*, 1996) sono disegnati sul *left border* (LB) e *right border* (RB), mentre quelli per il gene *HDA19* alla fine del primo esone (*HDA19 F*) e alla fine del secondo esone (*HDA19 R*). In blu si riportano gli esoni, in verde gli introni, in rosso il T-DNA con i rispettivi LB ed RB (arancio).



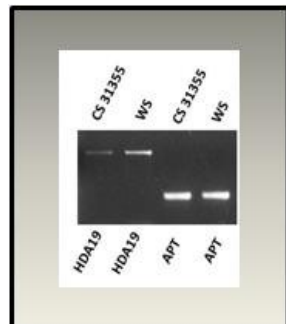
**Tabella 9:** Sequenze amplificate per ciascuna coppia di primer utilizzata nella linea CS 31355.

Primer	Amplificato (bp)
HDA19 F + HDA19R	800
HDA19 F + T-DNA R	—
HDA19 F + T-DNA F	600
HDA19 R + T-DNA R	100
HDA19 R + T-DNA F	—
T-DNA F + T-DNA R	300

La PCR ha confermato che il fenotipo di semisterilità era associato alla presenza dell'inserzione in condizione sia omozigote che eterozigote.

L'analisi RT-PCR è stata condotta mediante primer disegnati nel primo esone e nel 3' UTR. Essa ha indicato la presenza del trascritto nella progenie delle piante omozigoti per l'inserzione, anche se in quantità inferiore rispetto al controllo (Fig 4). Per un'ulteriore verifica, il trascritto ottenuto in questa analisi è stato sequenziato ed i risultati hanno indicato una possibile traslocazione del 3' UTR in corrispondenza del secondo esone.

**Figura 4: RT-PCR.** Livello di espressione del gene *HDA19* nella linea CS 31355 e nel controllo (Ws). Il gene *APT* è usato come normalizzatore.



Per determinare il ruolo del gene *HDA19* nel processo meiotico è stata analizzata la microsporogenesi nella linea CS31355 a confronto con il controllo WS (Fig 5). Durante la profase I il leptotene e lo zigotene non evidenziano differenze nel mutante rispetto al controllo. In pachitene, in WS i cromosomi risultano appaiati per tutta la loro lunghezza (Fig. 5 a) mentre nella linea CS31355 sono state osservate regioni di mancato appaiamento (Fig 5 b). Nel controllo, si osservano in diacinesi 5 bivalenti uniti a livello dei chiasmi (Fig 5 c) che successivamente si allineano sulla piastra metafase (Fig 5 e). Nel mutante in diacinesi e metafase I sono stati osservati con una frequenza del 17% (n. meiociti=17) meiociti con 2 univalenti oltre ai 4 bivalenti (Fig 5 d, f). La presenza di univalenti indica che il crossover obbligato necessario per tenere uniti gli omologhi fino alla metafase I fallisce nel mutante per una coppia cromosomica. Durante la profase II, nella linea CS31355, oltre ai meiociti regolari, sono state osservate diverse anomalie: cromatidi fratelli che si separano prematuramente (Fig 5 h), cromosomi e cromatidi associati in maniera irregolare (Fig 5 i). Nel controllo si osservano con regolarità 5 cromosomi ad ogni polo (Fig 5 g). Al termine del processo meiotico la linea CS31355 produce oltre ai prodotti regolari con 4 nuclei, ciascuno recante 5 cromosomi, come in WS (Fig 5 l), anche meiociti contenenti nuclei con un numero sbilanciato di cromosomi (Fig 5 m).

**Figura 5:** Analisi della microsporogenesi nella linea CS31355 (b, d, f, h, i, m) e nel controllo WS (a,c, e, g, l). In pachitene (b) nel mutante si evidenziano regioni di mancato appaiamento dei cromosomi. Durante la diacinesi (d) e la metafase I (f) la linea CS31355 presenta nuclei contenenti 2 univalenti (d, f) (indicati dalle frecce). In profase II (g, h, i), nella linea CS31355, si osservano separazione prematura dei cromatidi (h) ed associazioni irregolari (i). In telofase II si formano nuclei con un numero sbilanciato di cromosomi (m). Bar=10 $\mu$ M (**Cont.**)

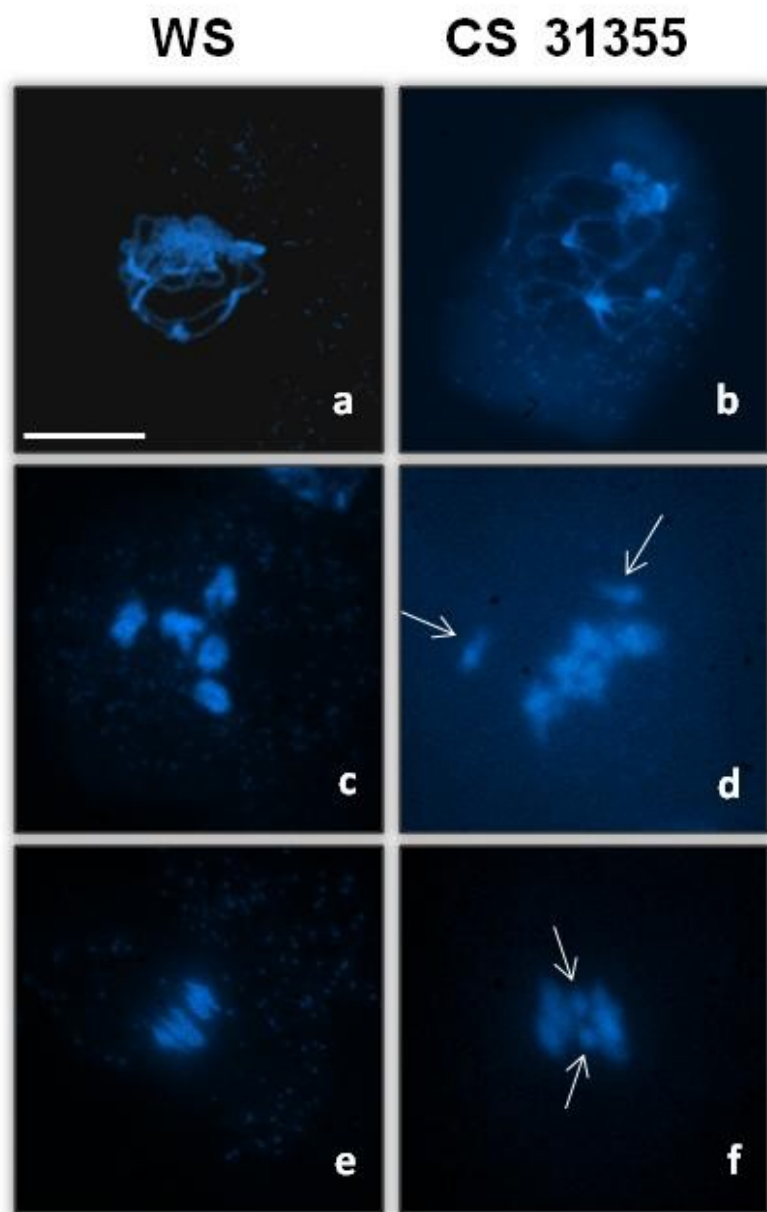
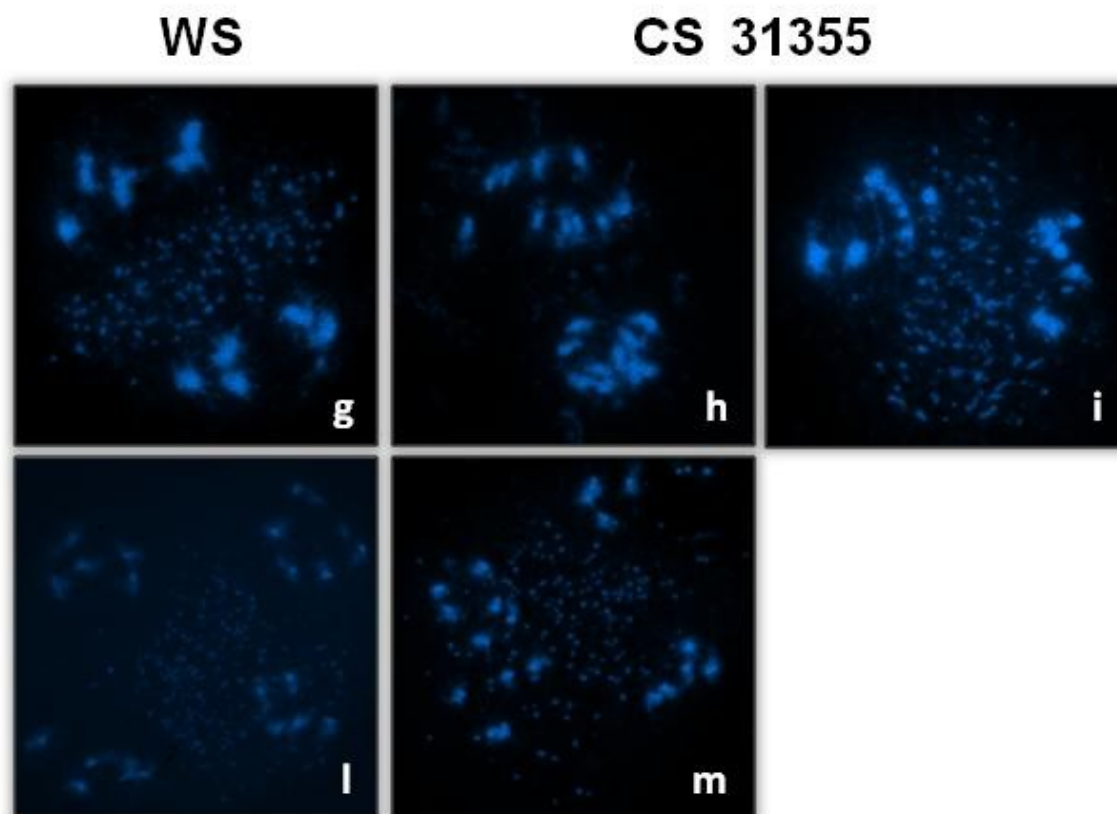


Figura 5 (Cont.)



### 3.1.5 Geni HAT/HDAC identificati in silico come candidati ad avere un ruolo in meiosi.

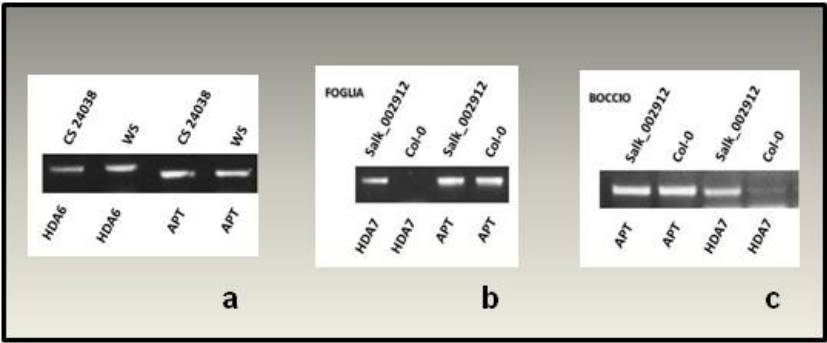
Per focalizzare l'attenzione sui geni *HAT/HDAC* che potessero essere candidati ad avere una funzione in meiosi sono state condotte presso il nostro laboratorio analisi bioinformatiche (Aiese Cigliano R., comunicazione personale). Tramite queste è stato assegnato a ciascun gene un punteggio che teneva in considerazione l'espressione differenziale nei tessuti riproduttivi di *Arabidopsis* ed il ruolo meiotico dell'omologo in altri organismi modello. Dalle analisi è emerso che i geni con maggiore punteggio erano *HDA6*, *HDA7*, *HDA9* e *HDA19*. Mentre quest'ultimo era già stato analizzato, poiché la linea CS 31355 aveva evidenziato semisterilità della siliqua nel primo screening, le linee corrispondenti ai geni *HDA6*, *HDA7* e *HDA9*, non avendo mostrato alcun fenotipo, non erano state sottoposte ad ulteriori analisi. Pertanto su queste linee sono state effettuate analisi molecolari e di fertilità pollinica. La linea SALK\_007123 per *HDA9* presumibilmente non ha l'inserzione.

La linea RNA-i CS 24038 (*HDA6*) non ha mostrato sterilità a livello del polline. L'analisi RT-PCR ha indicato che il gene *HDA6* si esprime sebbene a livelli inferiori rispetto al controllo (WS) (Fig 6 a).

Sulla linea SALK\_002912 (*HDA7*) l'analisi PCR ha confermato la presenza dell'inserzione. Sulla progenie di una pianta risultata omozigote per l'inserzione sono state effettuate verifiche per la fertilità pollinica, che appare normale, e di espressione. In letteratura (Schmid *et al.*, 2005) è riportato che *HDA7* non è espresso in foglia. Per tale motivo nella linea SALK\_002912 l'RT-PCR è stata condotta sia sull'RNA estratto da foglia che su quello estratto da boccio (Fig 6 b, c). Come atteso, in foglia il trascritto del gene non è presente nel controllo (Col-0) (Fig 6 b). Il trascritto, tuttavia, è presente nella linea

mutante. In boccio il trascritto del gene è presente sia nella linea mutante sia in Col-0, ma in quantità superiore nel mutante (Fig 6 c), facendo ipotizzare che l'inserzione agisca come un “activation-tagging”.

**Figura 6: RT-PCR:** Livello dei trascritti del gene *HDA6* nella linea CS 24038 (a) e del gene *HDA7* in foglia (b) e in boccio (c) nella linea SALK\_002912 e nei rispettivi controlli (WS e Col-0). Il gene APT è usato per la normalizzazione.



### 3.2 Acetilazione e metilazione istonica nella microsporogenesi di *Arabidopsis*

Allo scopo di determinare l’andamento dell’acetilazione e della metilazione istoniche durante la meiosi maschile di *Arabidopsis* è stata effettuata l’immunolocalizzazione usando diversi anticorpi che riconoscono specifici residui di lisina (K) acetilati o metilati sull’istone H3 o H4. I risultati complessivi sono riportati nella tabella 10.

**Tabella 10:** Schema riassuntivo dei risultati dell’immunolocalizzazione dei residui di lisina acetilati (H3K9K14, H3K9, H4K16 ed H4K5) e metilati (H3K4me3) sugli istoni H3 ed H4 in ciascuna fase della meiosi maschile in *Arabidopsis*.

Anticorpi	P I		M I	A I	T I	P II	M II	A II	T II	Tetrate	Microspora
	precoce	tardiva									
H3K9K14ac	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H3K9ac	±	±	n.a.	n.a.	n.a.	±	±	±	±	±	±
H4K16ac	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H4K5ac	+	+	+	n.a.	n.a.	+	+	+	+	+	+
H3K4me3	+	+	n.a.	+	+	+	+	n.a.	+	+	+

(segnale ± = debole; + = forte)

Di seguito si descrivono nel dettaglio i risultati ottenuti con ogni anticorpo.

#### 3.2.1 Immunolocalizzazione dei residui di lisina acetilati

Per stabilire lo stato dell’acetilazione durante la meiosi sono stati impiegati quattro anticorpi: anti-H3K9K14ac, che riconosce l’istone H3 acetilato sulle lisine 9 e/o 14; l’anticorpo anti-H3K9ac, che riconosce l’istone H3 acetilato sulla lisina 9; gli anticorpi anti-H4K5ac e anti-H4K16ac, che riconoscono l’istone H4 acetilato sulla lisina 5 e 16, rispettivamente.

##### a) *H3K9K14ac*

I risultati relativi all’immunolocalizzazione dell’istone H3 acetilato (H3K9K14ac) sono riportati nella figura 7. Come atteso, il segnale dell’anticorpo colocalizza con la cromatina. Durante la profase I i cromosomi condensano progressivamente l’H3 appare acetilato sia nella sottofase zigotene (Fig 7 a, b), in cui inizia il processo della sinapsi, sia in diacinesi

(Fig 7 c, d), in cui i cromosomi appaiono come 5 bivalenti. Il segnale persiste sui cromosomi condensati che si allineano sulla piastra equatoriale in metafase I (Fig 7 e, f) e durante la separazione degli omologhi in anafase I (Fig 7 g, h). Nella meiosi II, il segnale è presente sui nuclei parzialmente decondensati della profase II (Fig 7 i, l) e sui cromosomi nuovamente condensati delle fasi successive. Infatti l'acetilazione dell'H3 è presente quando i cromosomi si allineano sulle due piastre equatoriali in metafase II (Fig 7 m, n), si separano nei cromatidi fratelli in anafase II (Fig 7 o, p) e costituiscono i 4 nuclei aploidi in telofase II (Fig 7 q, r). Infine, il segnale persiste sui nuclei della tetrade, in cui è avvenuta la citocinesi e si sono formate quattro cellule aploidi (Fig 7 s, t) fino allo stadio di microspora (Fig 7 u, v).

**Figura 7:** Immunolocalizzazione dei residui acetilati K9 e/o K14 sull'istone H3 (H3K9K14ac) nei microsporociti dell'ecotipo Col-0. Per ciascuna delle fasi meiotiche analizzate, è mostrata nella stessa cellula la localizzazione dell'anticorpo (destra) e la colorazione del DNA con il DAPI (sinistra). L'acetilazione è presente nel nucleo/cromosomi a tutte le fasi osservate: zigotene (a, b), diacinesi (c, d), metafase I (e, f), anafase I/telofase I (g, h), profase II (i, l), metafase II (m, n), anafase II (o, p), telofase II (q, r), tetrade (s, t) e microspora (u, v). Bar, 10µM. **(Cont.)**

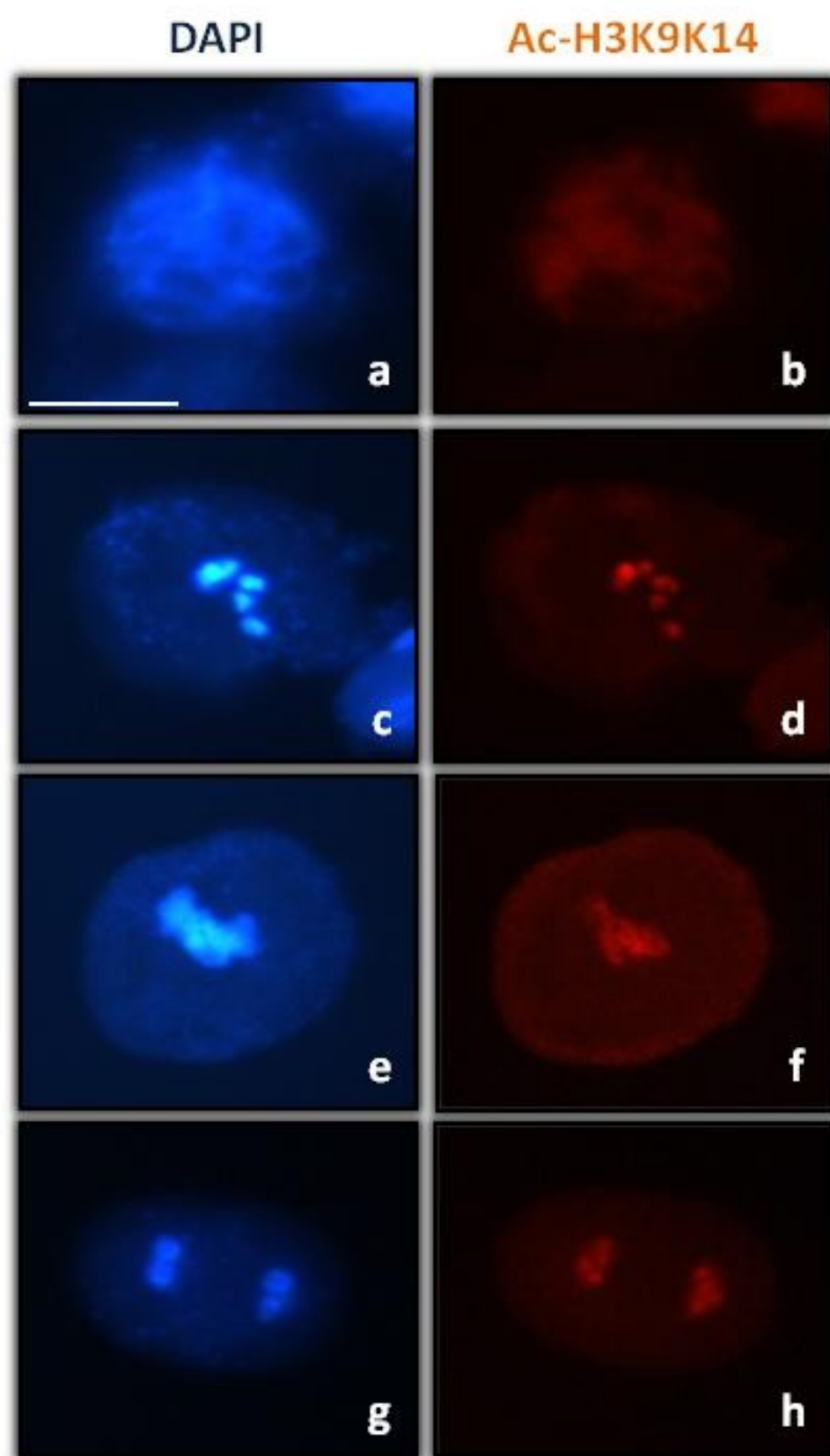




Figura 7 (Cont.)

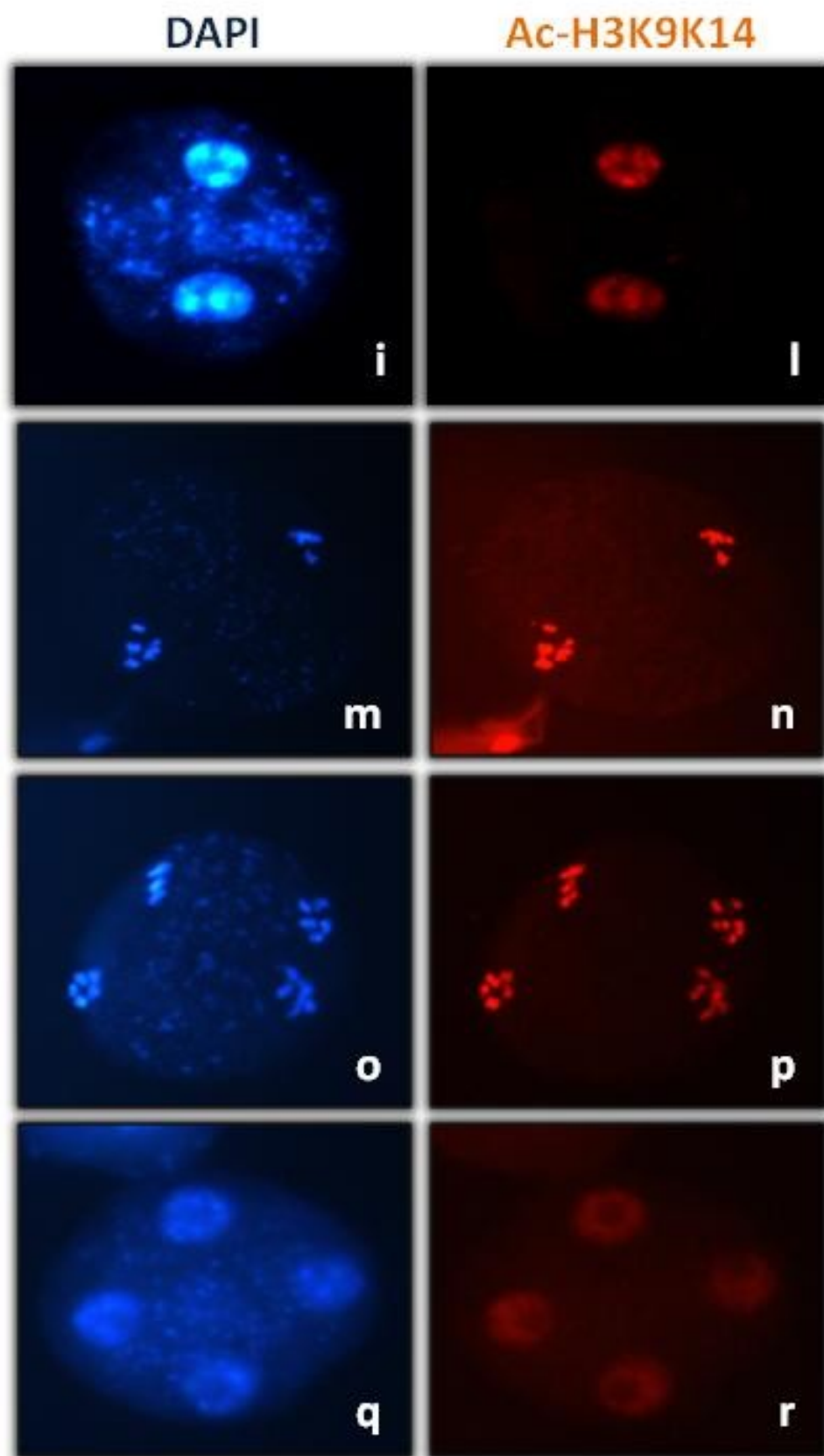
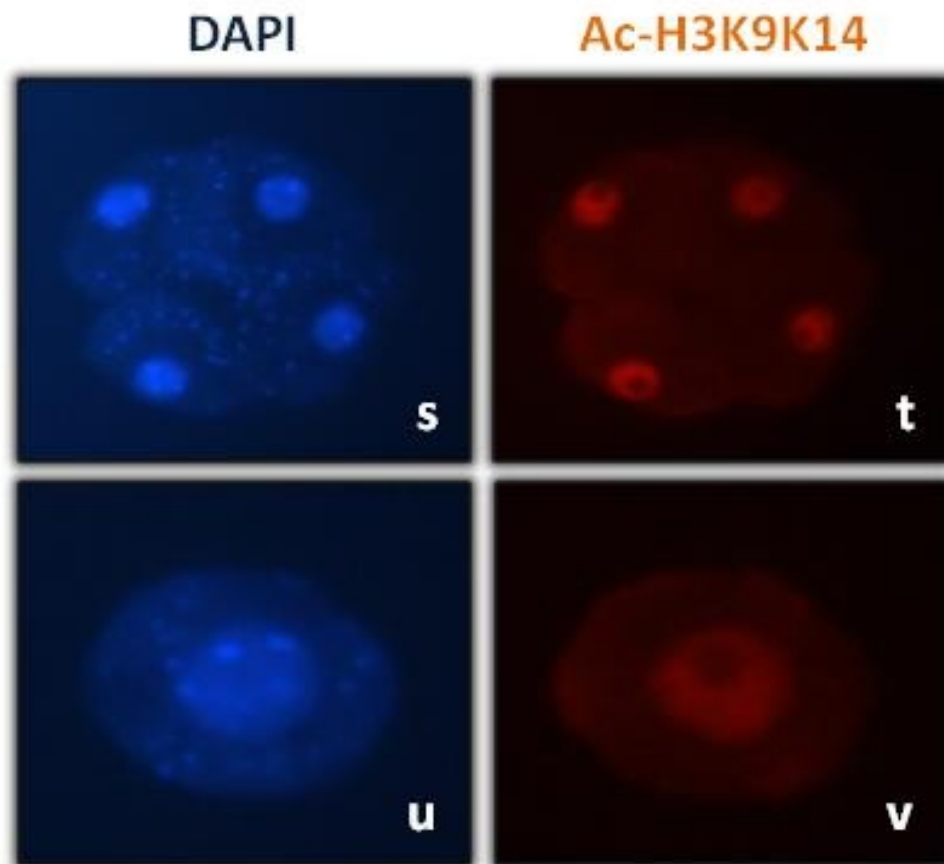


Figura 7 (Cont.)



#### b) H3K9ac

La localizzazione dell'H3K9ac è stata analizzata mediante l'uso di un anticorpo ancora sperimentale, e la sua dinamica è riportata in figura 8. È stata osservata una debole fluorescenza della cromatina in uno stato ancora largamente decondensato nel leptotene (Fig 8 a, b); la riduzione del segnale nella sottofase zigotene è accompagnata da un addensamento del segnale nella zona perinucleolare, come indicato in figura 8 (c, d). Nella diacinesi il segnale più intenso si osserva invece sul nucleolo (Fig 8 e, f). Una forte colorazione del nucleolo si ritrova anche in profase II (Fig 8 g, h), dove una debole marcatura caratterizza i 2 gruppi di cromosomi. In metafase II (Fig 8 i, l) ed anafase II (Fig 8 m, n) il segnale si ritrova ancora molto debole sui cromosomi condensati. Di nuovo all'inizio della telofase II si osserva la marcatura del nucleolo (Fig 8 o, p) e, in una fase successiva (Fig 8 q, r), quella della zona perinucleolare. L'acetilazione dell'H3K9 persiste debolmente sui nuclei anche nelle fasi di tetrade (Fig 8 s, t) e microspora (Fig 8 u, v), in cui non è stato rilevato il segnale sul nucleolo.

Poiché quest'anticorpo sembra riconoscere anche elementi del citoscheletro, presumibilmente i microtubuli (MT) organizzati intorno al nucleo durante gli stadi di profase I, telofase II e microspora (Fig 8 a,b; o-v), la specificità di quest'anticorpo risulta incerta.

**Figura 8 :** Immunolocalizzazione dei residui K9 acetilati sull'istone H3 (H3K9ac) nei microsporociti dell'ecotipo Col-0. L'acetilazione è debole sulla cromatina al leptotene (a, b) e si localizza principalmente nella zona perinucleolare allo zigotene (c, d), come indicato dalle frecce. Durante il diplotene (e, f) si osserva un forte segnale sul nucleolo che è presente anche in profase II (g, h) (frecce). In metafase II precoce (i, l) ed anafase II (m, n) il segnale è presente debolmente sui cromosomi, mentre all'inizio della telofase II (o, p) si osserva di nuovo la marcatura dei nucleoli e, alla fine telofase II (q, r) la marcatura della zona perinucleolare. **(Cont.)**

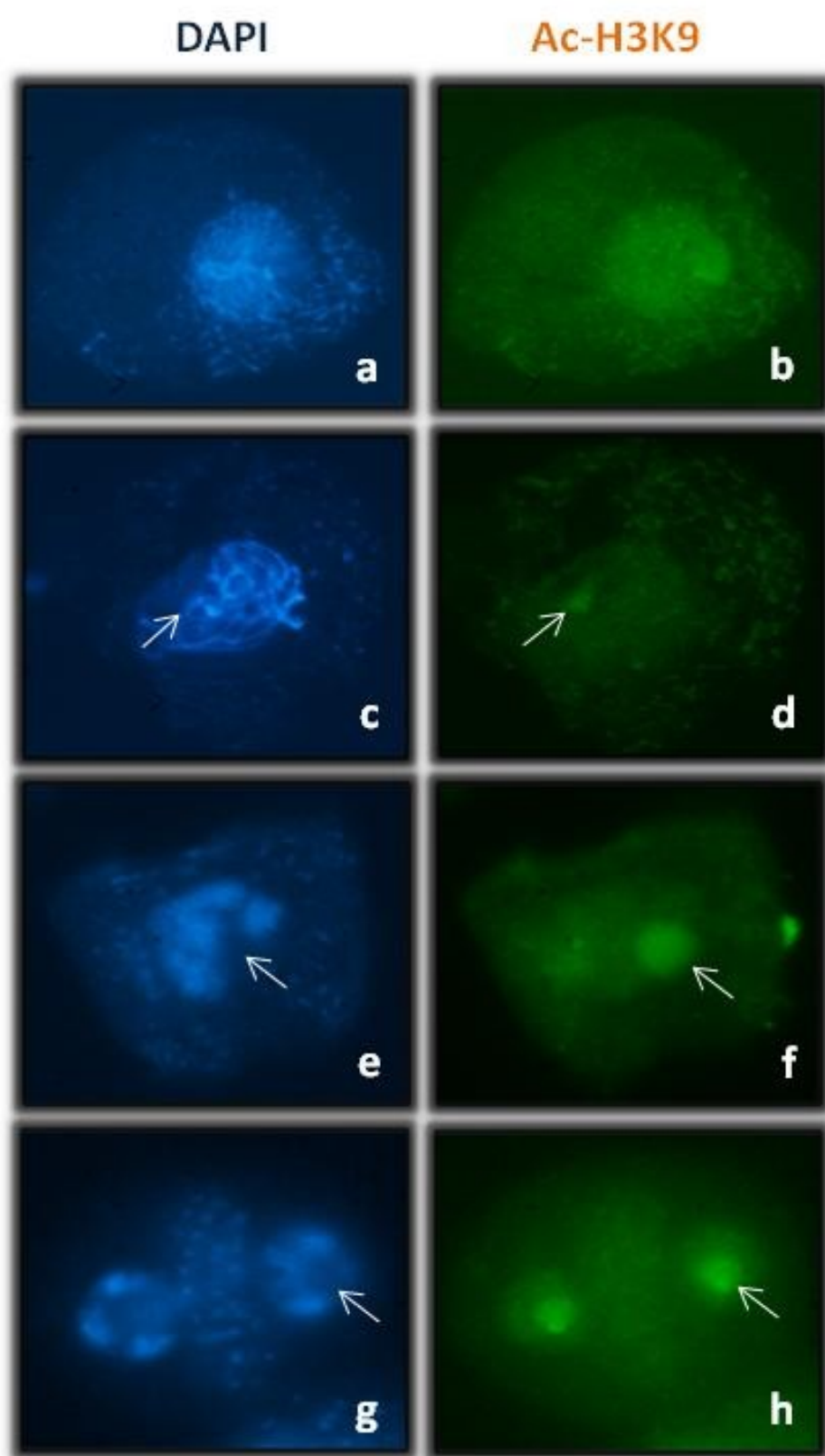


Figura 8 (Cont.)

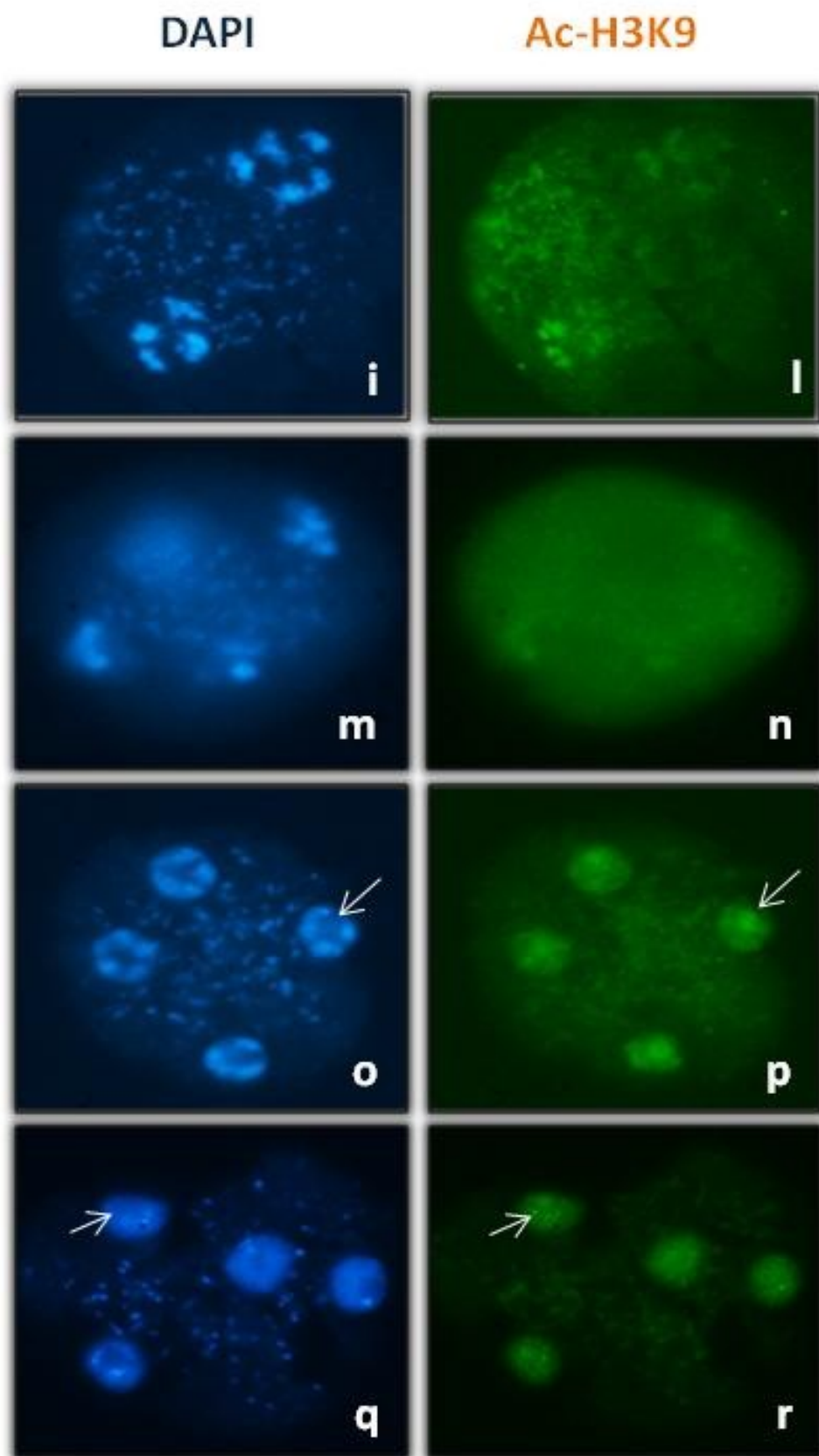
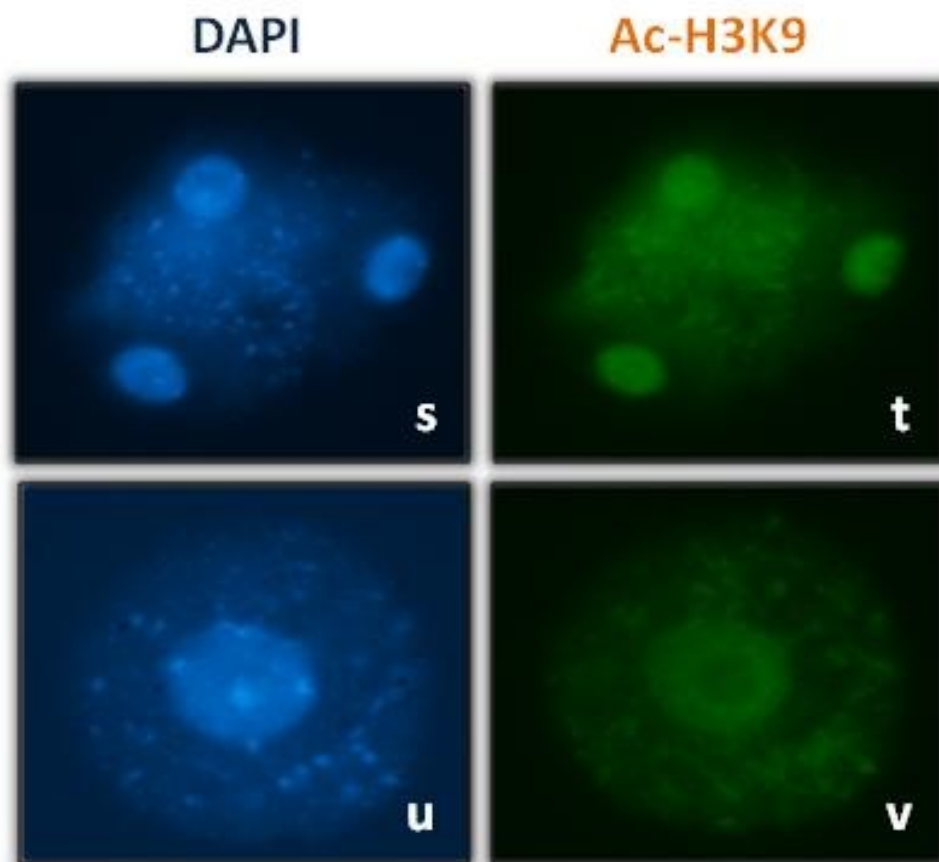


Figura 8 (Cont.)



*c) H4K16ac*

Il segnale dell'anticorpo anti-H4K16ac è stato rilevato in tutti gli stadi della meiosi analizzati. Colocalizza con il nucleo/cromosomi durante le sottofasi osservate della profase I: leptotene (Fig 9 a, b), zigotene (Fig 9 c, d) e diplotene (Fig 9 e, f), in cui i cromosomi omologhi di ciascuna coppia di bivalenti appaiono uniti a livello dei chiasmi (Fig 9 g-w). L'acetilazione dell'H4K16 persiste sui cromosomi durante tutti i successivi stadi della meiosi I e II.

**Figura 9:** Immunolocalizzazione dei residui K16 acetilati sull'istone H4 (H4K16ac) nei microsporociti dell'ecotipo Col-0. L'acetilazione è presente sulla cromatina durante le sottofasi della profase I: leptotene (a, b), zigotene (c, d) e diplotene (e, f) e colocalizza con i cromosomi durante tutti i successivi stadi della meiosi I e II. Metafase I (g, h), anafase I/telofase I (i, l), profase II (m, n), metafase II (o, p), anafase II (q, r), telofase II (s, t), tetrade (u, v) e microspora (z, w) **(Cont.)**

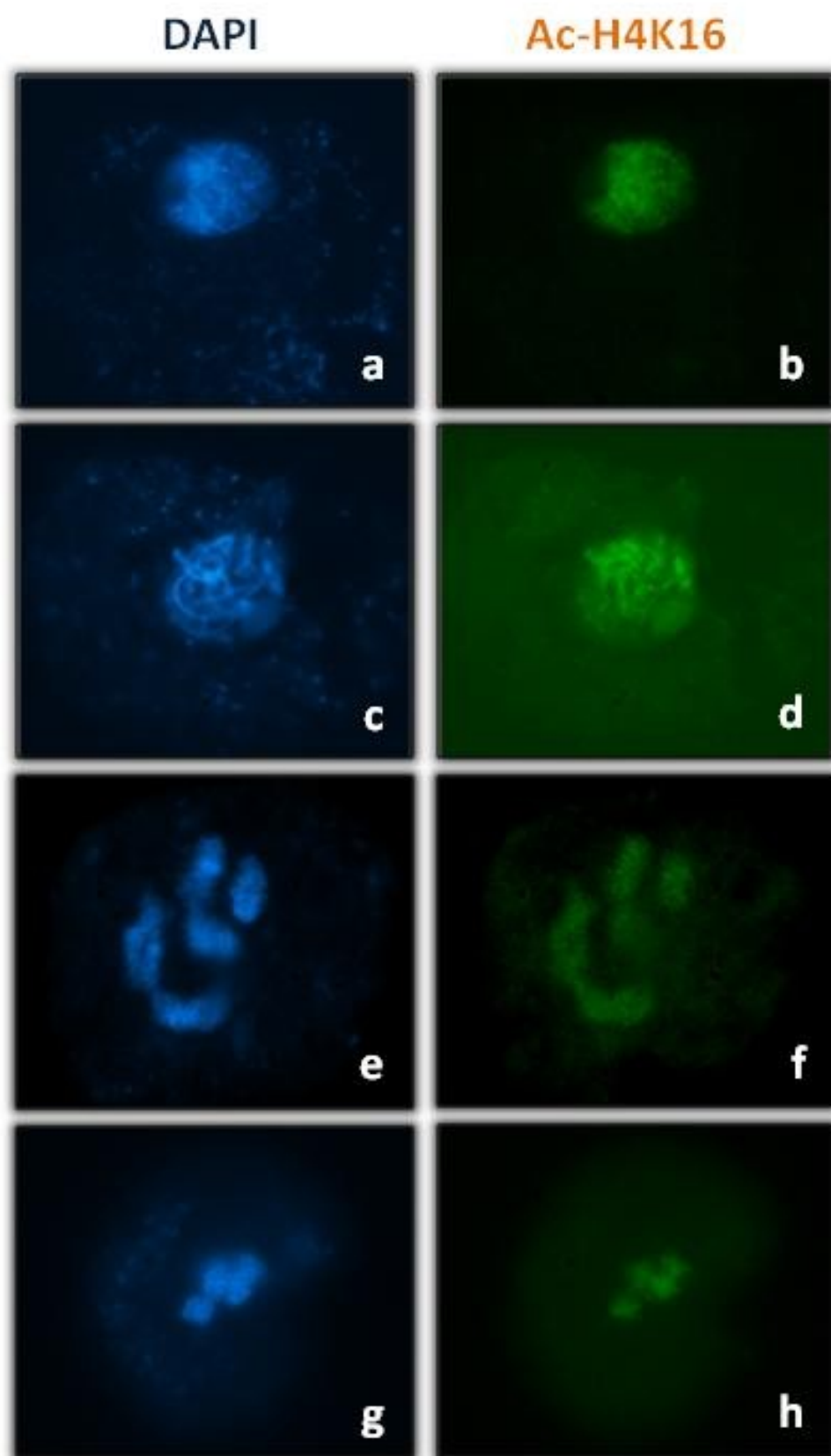


Figura 9 (Cont.)

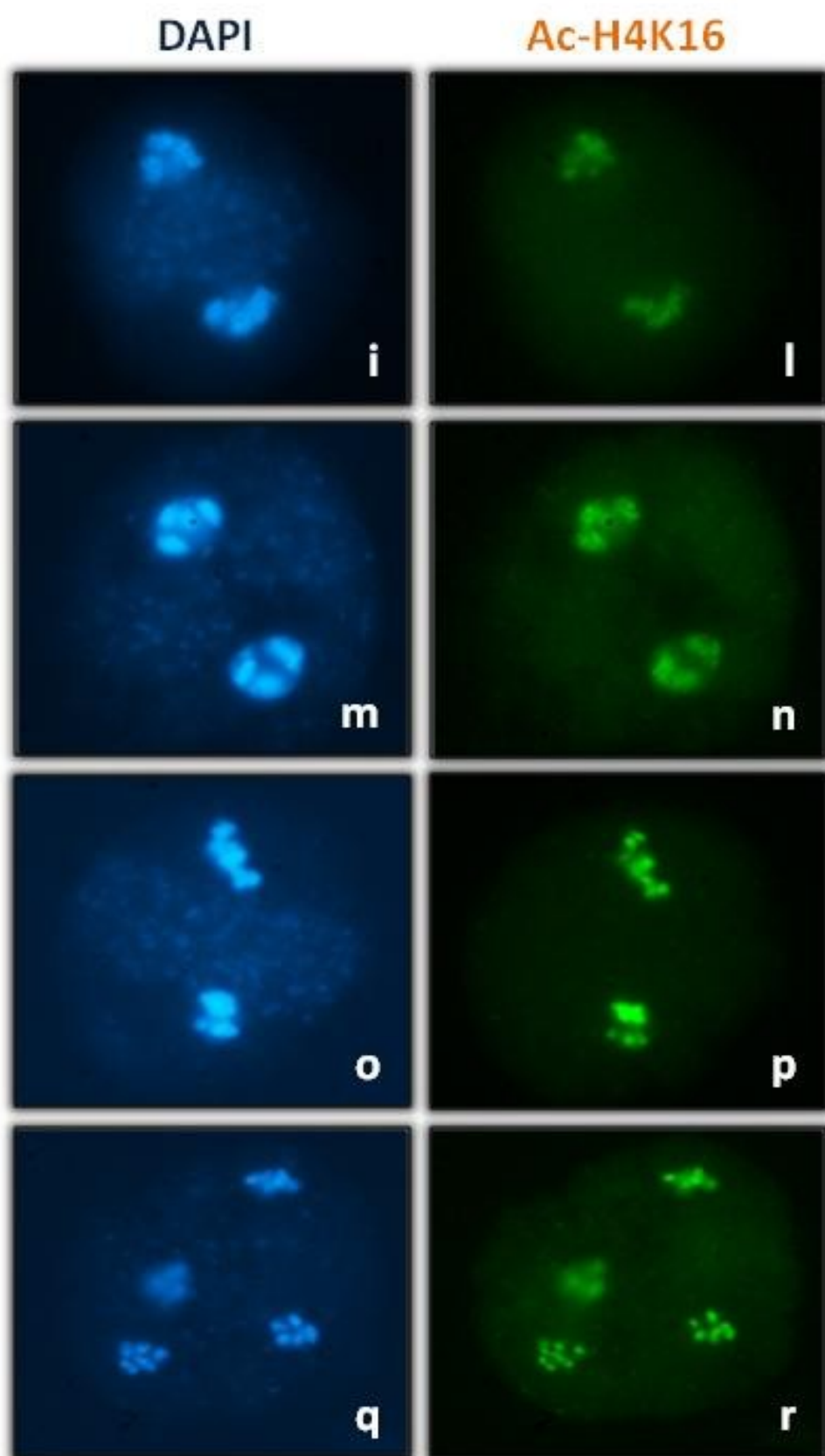
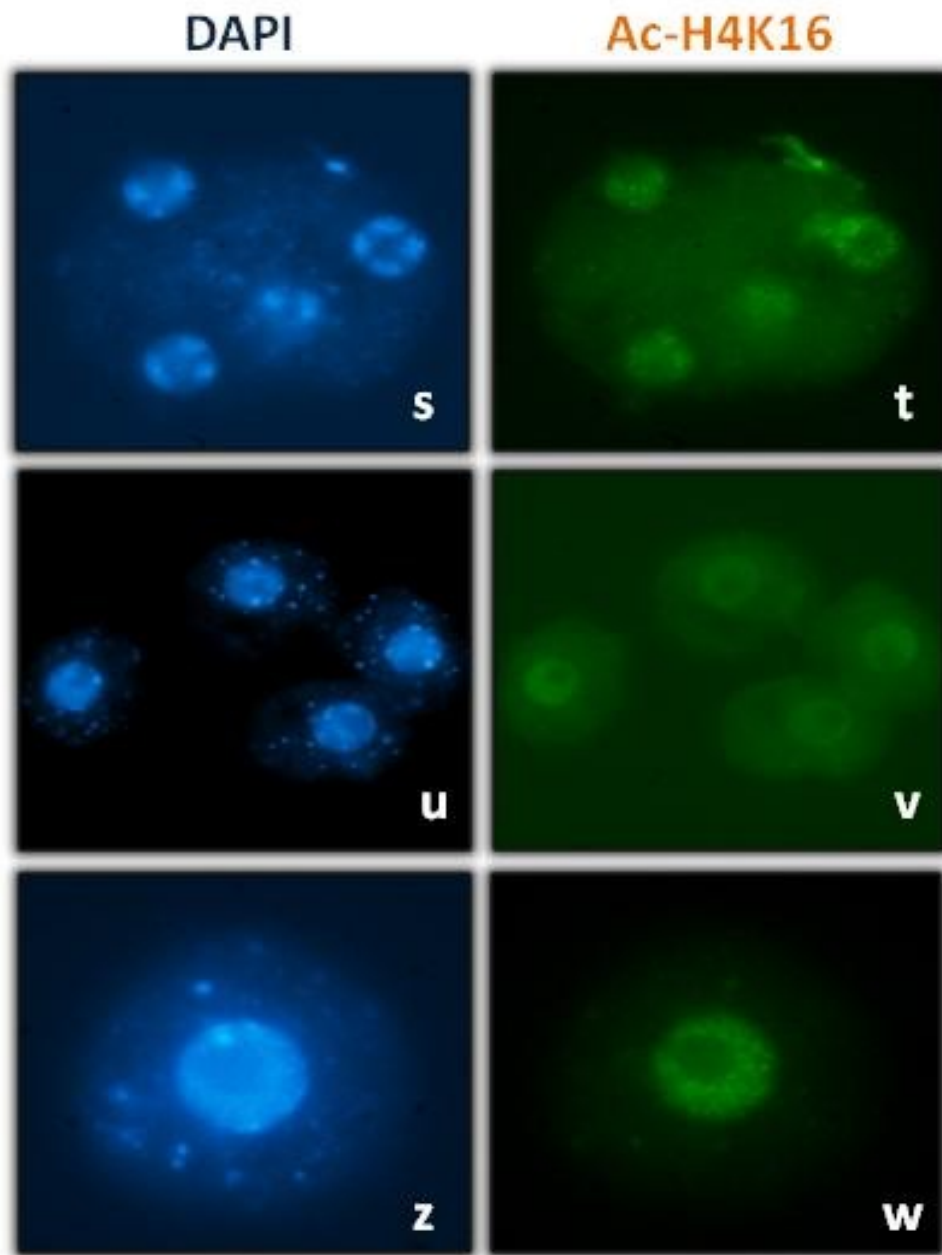




Figura 9 (Cont.)



*d) H4K5ac*

È stato riportato che l'acetilazione dell'H4 avviene in maniera progressiva procedendo dalla lisina 16, attraverso la 12 e la 8, fino alla lisina 5. L'immunolocalizzazione dell'H4K5ac è dunque indicativa della forma iperacetilata dell'istone H4.

L'analisi dell'H4K5ac, come quella dell'H4K16ac, ha mostrato un segnale costantemente associato al nucleo/cromosomi durante tutti gli stadi finora osservati per la meiosi I e per la meiosi II. Infatti, in meiosi I, è presente nelle sottofasi zigotene (Fig 10 a, b) e diacinesi (Fig 10 c, d) e nella metafase I (Fig 10 e, f). Il segnale è ancora presente sul nucleo/cromosomi durante tutti gli stadi della meiosi II.

**Figura 10:** Immunolocalizzazione dei residui K5 acetilati sull'istone H4 (H4K5ac) nei microsporociti dell'ecotipo Col-0. L'anticorpo colocalizza con la cromatina nelle sottofasi della profase I: zigotene (a, b) e diacinesi (c, d) e in metafase I (e, f). Il segnale è presente sui cromosomi anche durante la meiosi II: profase II (g, h), metafase II (i, l), anafase II (m, n), telofase II (o, p), nella tetrade (q, r) e nella microspora (s, t). **(Cont.)**



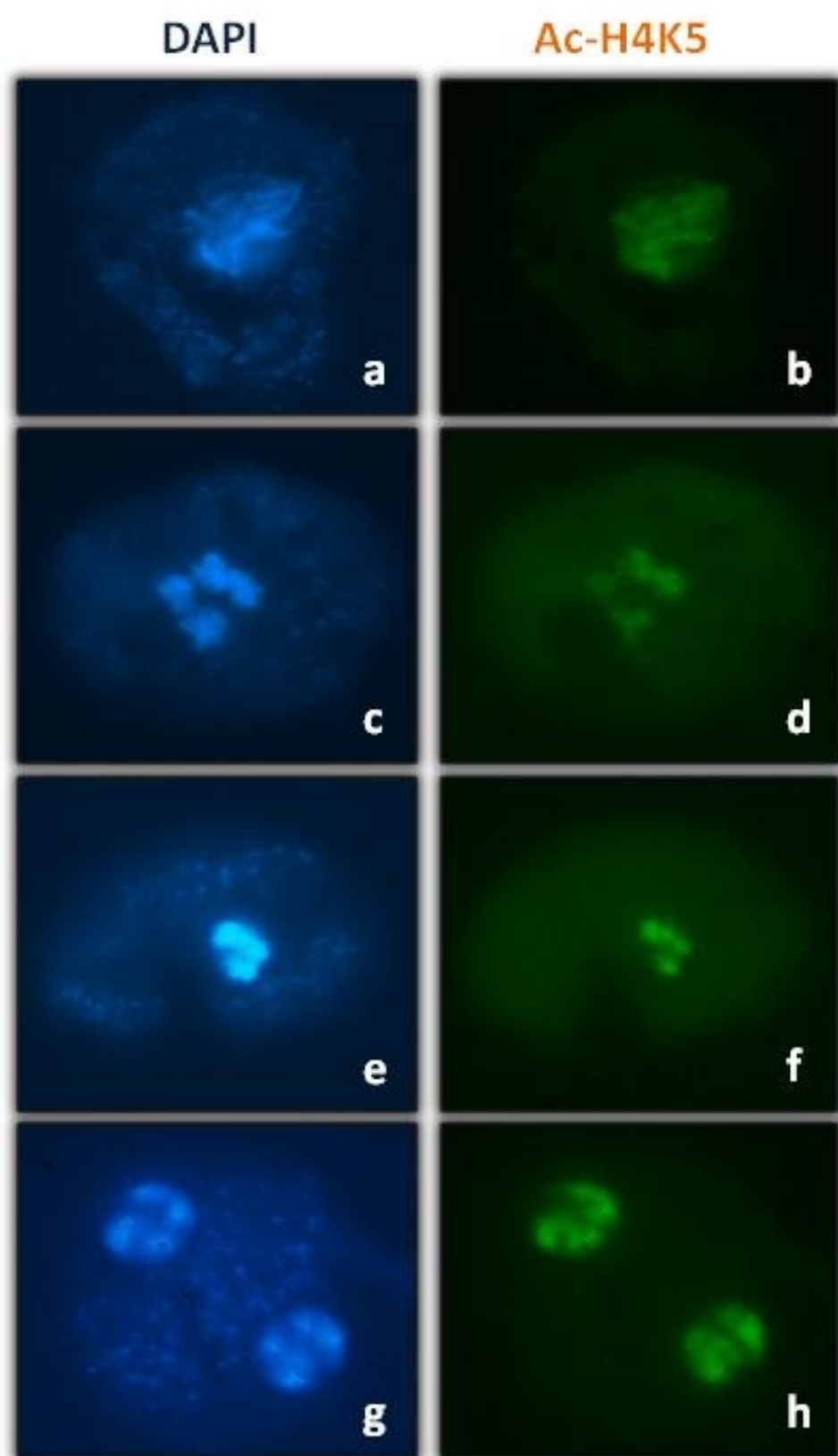


Figura 10 (Cont.)

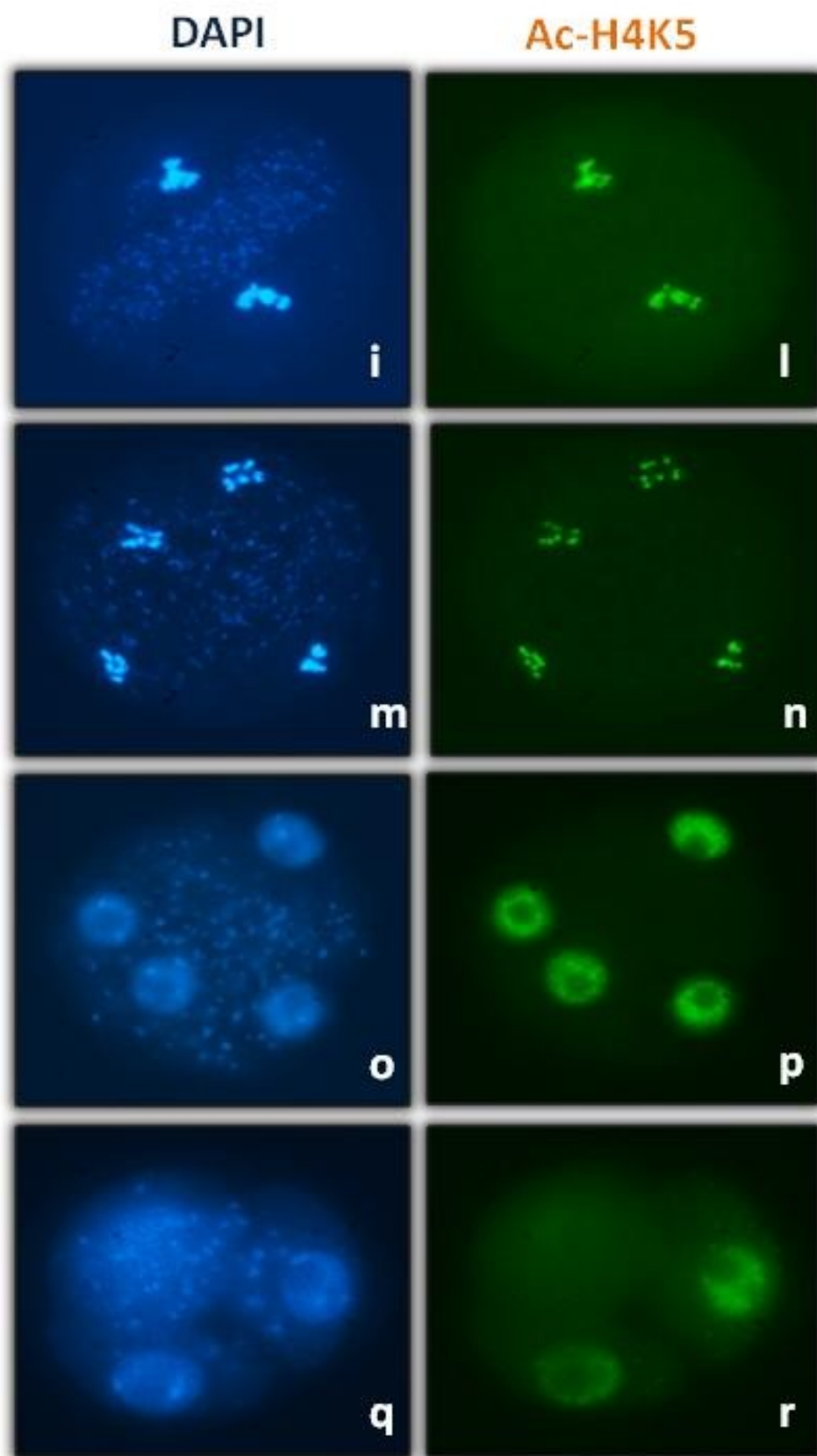
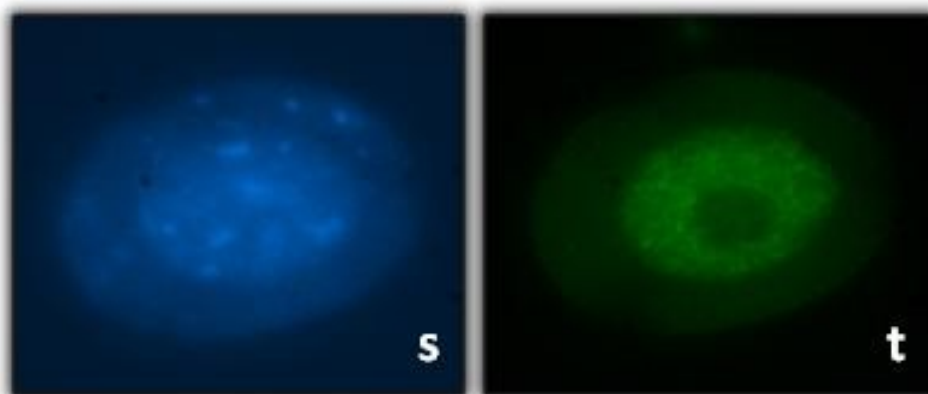


Figura 10 (Cont.)



### 3.2.2 Immunolocalizzazione dell'H3K4 trimetilato (H3K4me3)

E' stato dimostrato di recente che l'H3K4me3 è un mark epigenetico di particolare importanza nella ricombinazione meiotica in diversi organismi. Per tale motivo tra le diverse lisine dell'H3 che sono metilate in pianta e tra i diversi livelli di metilazione si è deciso di iniziare lo studio della metilazione istonica in meiosi con H3K4me3. Le analisi effettuate mediante l'impiego di un anticorpo ancora sperimentale, hanno mostrato che l'H3K4me3 colocalizza con i cromosomi durante tutti gli stadi meiotici finora esaminati. Inoltre è stato osservato che la tri-metilazione del K4 è assente dai blocchi eterocromatici (indicati dalle frecce) negli stadi analizzati in cui è possibile distinguere l'eucromatina dall'eterocromatina, ossia pachitene (Fig 11 a, b), profase II (Fig 11 g, h) e telofase II (Fig 11 m, n).

**Figura 11:** Immunolocalizzazione dei residui K4 tri-metilati sull'istone H3 nell'ecotipo Col-0. Il segnale di acetilazione è presente sui cromosomi in pachitene ed esclude i blocchi eterocromatici come indicato dalle frecce (a, b). Lo stesso si può osservare in profase II (g, h) ed in telofase II (m, n). Nelle restanti fasi esso si localizza sul DNA/cromosomi. Diplotene (c, d), anafase I/telofase I (e, f), metafase II (i, l), tetrade (o, p) e microspora (q, r). **(Cont.)**

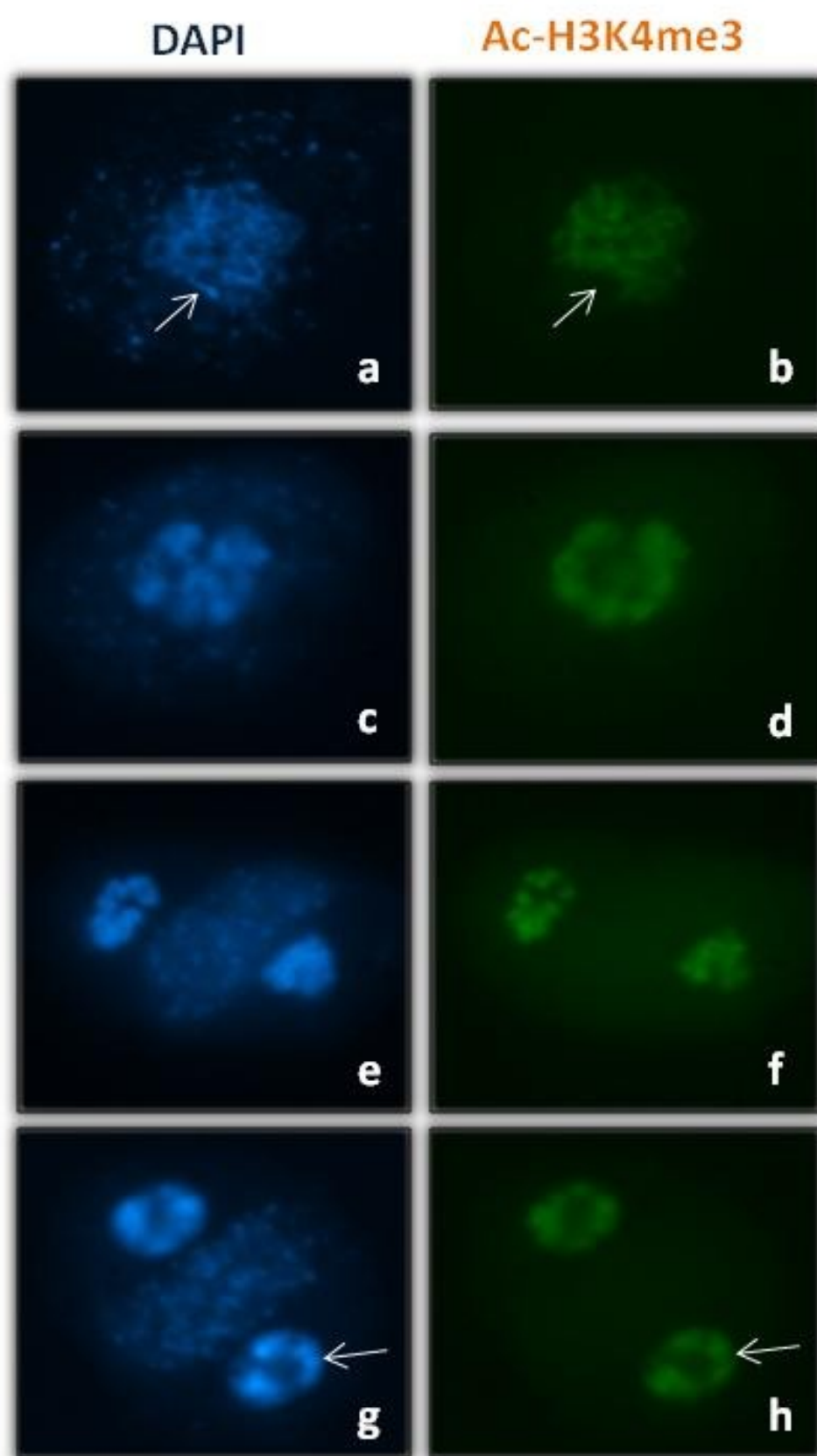
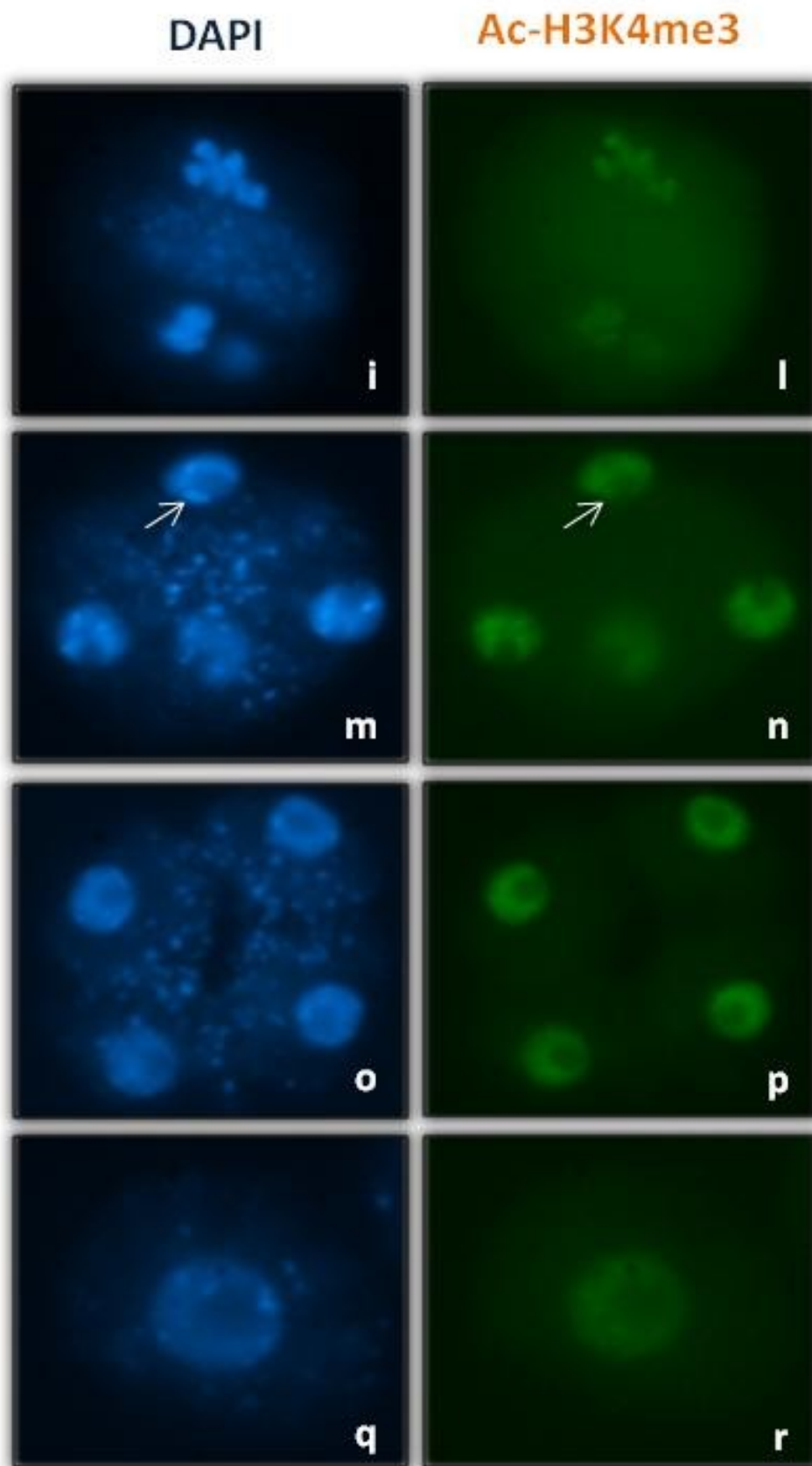


Figura 11: (Cont.)



## 4. DISCUSSIONE

Negli scopi della presente tesi c'è quello di comprendere il ruolo dell'acetilazione e della metilazione istoniche nella meiosi di pianta utilizzando diverse strategie nella specie modello *Arabidopsis thaliana*. In particolare, è stata pianificata un'analisi funzionale sistematica dei geni codificanti per le HAT/HDAC di *Arabidopsis* e sono state analizzate l'acetilazione e la metilazione degli istoni durante la meiosi maschile mediante immunolocalizzazione.

### 4.1 Analisi dei geni codificanti per le HAT/HDAC in *Arabidopsis*

Per l'analisi funzionale sono state privilegiate rispetto alle linee RNAi, le linee inserzionali (T-DNA) che consentono di ottenere mutazioni specifiche per un singolo gene. Nel caso delle linee RNAi bisogna considerare l'eventualità che il silenziamento non sia specifico a causa dell'elevata similarità dei geni *HAT/HDAC* nell'ambito di una stessa famiglia.

Per l'analisi delle linee inserzionali ed RNAi ci siamo basati inizialmente sulla valutazione di caratteri fenotipici di facile osservazione. In particolare, su tutti i mutanti è stato effettuato uno screening fenotipico preliminare prendendo in considerazione la semisterilità della siliqua. La sterilità parziale o totale è generalmente il carattere su cui si basa la selezione di mutanti meiotici in pianta, poiché in ampie popolazioni rappresenta il carattere più facile da individuare come indice di anomalie nel processo riproduttivo (Mercier *et al.*, 2001a; Consiglio *et al.*, 2007). Generalmente, i mutanti meiotici isolati in *Arabidopsis* hanno evidenziato una produzione di seme ridotta o assente (Couteau *et al.*, 1999; Grelon *et al.*, 2001; Schommer *et al.*, 2003). La presenza del fenotipo semisterile è stata osservata anche in mutanti di *Arabidopsis* con modificazioni nel livello di acetilazione degli istoni. Tra le HDAC, sia il mutante transgenico *cash126*, con espressione antisense stabile del gene *HD1* (*HDA19*), sia il mutante *Athd1-t1* con un'inserzione T-DNA nello stesso gene *HD1*, hanno una ridotta fertilità (Tian *et al.*, 2001; 2003). Un ridotto numero di semi caratterizza anche le silique di piante transgeniche antisense per il gene *AtHD2A* (Wu *et al.*, 2000) e del mutante *hda6<sup>ts1</sup>*. In quest'ultimo caso, però, il fenotipo di semisterilità interessa soltanto le prime silique (Aufsatz *et al.*, 2002). Tra le HAT, una ridotta fertilità è stata osservata nei mutanti *hac1* e *gcn5/dlx8* (Deng *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2003; Vlachonasios *et al.*, 2003). Il fenotipo semisterile dei mutanti sopra riportati non è stato però indagato. Invece, nei doppi mutanti *HAM1/ham1 ham2/ham2* (Latrasse *et al.*, 2008) e in *mcc1* (Perrella *et al.*, 2010) il fenotipo semisterile è stato associato a difetti nella gametogenesi e nella microsporogenesi, rispettivamente.

Nella presente tesi, lo screening fenotipico è stato effettuato su un numero di piante variabile per ciascuna linea, in conseguenza della disponibilità di semi ottenuti dal NASC e della percentuale di germinabilità degli stessi. Dalla prima analisi sono state selezionate 7 linee semisterili, le cui progenie hanno confermato il fenotipo associato alla presenza dell'inserzione solo in due casi (SALK\_027726, CS 31355). Per le altre linee le analisi hanno suggerito l'assenza dell'inserzione (SALK\_007123, SALK\_119279) oppure l'assenza del fenotipo (SALK\_086287, SALK\_131994 e SALK\_045791). E' ipotizzabile, quindi, che la bassa fertilità osservata nella prima fase di screening sia dovuta a fattori ambientali indicati tra le possibili cause della ridotta produzione di semi (Drews *et al.*, 1998).

La linea SALK\_027726 (*HAM1*) ha evidenziato il fenotipo semisterile nella progenie e la presenza dell'inserzione. Questa linea era riportata dal NASC come omozigote per l'inserzione, ma l'analisi PCR ha indicato la presenza dell'inserzione in eterozigosi. In uno studio di caratterizzazione funzionale della famiglia MYST in *Arabidopsis*, Latrasse *et al.* (2008) hanno analizzato il ruolo dei geni *HAM1* ed *HAM2* mediante i mutanti per i singoli geni e nei doppi mutanti. Da questa analisi è emerso che *HAM1* ed *HAM2* erano

funzionalmente ridondanti, per cui la presenza di almeno uno dei due geni era sufficiente a garantire la completa fertilità anche nei mutanti recanti l'inserzione in uno solo dei due geni (SALK\_027726 e SALK\_106046). I doppi mutanti, invece, ottenuti incrociando le rispettive linee SALK, non erano vitali quando entrambe le inserzioni erano presenti in omozigosi. Manifestavano severi difetti nella gametogenesi quando una delle due inserzioni era presente in eterozigosi. Questo dato era discordante rispetto ai nostri risultati poiché la semisterilità, a livello sia di siliqua che di polline, era stata osservata nella linea SALK\_027726. Per questo motivo è stata effettuata una verifica PCR su questa linea con i primer specifici per la linea SALK\_106046, sospettando la presenza di un'inserzione anche nel gene *HAM2*. L'analisi PCR ha confermato che la linea SALK\_027726 in realtà conteneva due inserzioni, una nel gene *HAM1* ed una nel gene *HAM2* indicando che il fenotipo derivava da questa doppia inserzione.

L'altra linea, CS 31355, che ha evidenziato l'associazione tra semisterilità ed inserzione sarà discussa in dettaglio nel seguente paragrafo.

## 4.2 Analisi funzionale del gene *HDA19*

Le analisi fenotipiche della linea CS 31355 inserzionale per il gene *HDA19* hanno indicato che la semisterilità della siliqua segrega con un rapporto di 3:1 caratteristico di una mutazione dominante. Inoltre, il test di Alexander ha evidenziato che tutte le piante semisterili hanno una percentuale di polline sterile di circa il 40%. Questi dati sono in disaccordo con i risultati riportati precedentemente da Tian *et al.* (2003), che pur avendo osservato una ridotta produzione di semi nella stessa linea CS 31355 oltre a diverse anomalie dello sviluppo, descrivevano che tali anomalie, inclusa la sterilità, non erano osservabili nelle piante eterozigoti. Inoltre, analisi condotte al microscopio elettronico avevano indicato che il polline era apparentemente normale, per cui la riduzione di fertilità della siliqua era stata associata prevalentemente all'incompatibilità strutturale tra pistillo e stami che risultavano più corti rispetto al controllo.

In base ai nostri risultati, si può affermare, invece, che alla ridotta fertilità a livello di siliqua e di polline nella linea CS 31355 contribuiscono le anomalie meiotiche osservate nella microsporogenesi. Infatti, nel corso del pachitene, in cui normalmente si completa l'SC, ci sono regioni di mancata sinapsi degli omologhi. In diacinesi/metafase I c'è la formazione di univalenti. Durante la meiosi II si verificano anomalie nella segregazione che causano prodotti sbilanciati. I risultati dell'analisi molecolare lasciano ipotizzare che il trascritto in CS 31355 non funzioni correttamente compromettendo la produzione della deacetilasi istonica *HDA19* e causando, quindi, un effetto di iperacetilazione istonica. Nella presente tesi, l'analisi PCR della linea CS 31355 ha indicato la presenza in tandem di due copie di T-DNA, aventi lo stesso orientamento, all'interno del secondo esone del gene *HDA19*. Sorprendentemente, l'RT-PCR su una pianta omozigote per l'inserzione ha indicato la presenza di un trascritto con il peso molecolare atteso per il gene *HDA19*, anche se in quantità inferiore rispetto al controllo. Il sequenziamento del prodotto ottenuto, tuttavia, ha indicato un riarrangiamento del trascritto con traslocazione del 3'UTR. I riarrangiamenti cromosomici possono verificarsi in *Arabidopsis* in seguito all'inserzione di T-DNA dopo trasformazione con *Agrobacterium tumefaciens*. Castle *et al.* (1993) hanno osservato fino al 17% di riarrangiamenti nei mutanti "T-DNA tagged". I risultati dell'analisi RT-PCR in CS 31355 sono discordanti con quanto riportato da Tian *et al.* (2003). Infatti, questi autori con l'analisi RT-PCR non avevano rilevato alcun trascritto nelle piante omozigoti per l'inserzione, mentre era stato osservato il 5% di proteina attribuito al fatto probabile che l'anticorpo impiegato nell'analisi riconosceva la proteina *HDA6* molto simile ad *HDA19* (69% di identità della sequenza aminoacidica e 84% di similarità dell'N-terminale).

Si possono riscontrare diverse analogie nel comportamento meiotico tra il mutante *hda19*, studiato in questa tesi, e il mutante *mcc1* (Perrella *et al.*, 2010), che overesprime una

acetilasi istonica. L'iperacetilazione istonica dimostrata in *mcc1* e presunta in *hda19* potrebbe essere la causa delle anomalie meiotiche osservate in entrambi i mutanti. Le alterazioni nel processo di sinapsi sono state associate in *mcc1* ad anomalie nella formazione dell'elemento assiale dei cromosomi. In *hda19* le cause sono da accertare. L'iperacetilazione ha chiari effetti sul comportamento dei chiasmi: si osserva, infatti, in *mcc1* un cambiamento nella distribuzione dei CO. In particolare, nel cromosoma 2, nell'8% dei meiociti si formano 2 univalenti poichè fallisce la formazione del CO obbligato. Analogamente in *hda19* si osserva il 17% di meiociti con due univalenti sebbene sia ancora da accertare quale cromosoma/i siano coinvolti. Il ruolo dell'acetilazione istonica nella formazione dei CO è ben documentato anche in altri sistemi modello, per i quali è stato dimostrato l'effetto delle modifiche istoniche nella formazione dei DSB che marciano l'evento iniziale della ricombinazione meiotica. Come già anticipato nel paragrafo 1.4, la distribuzione dei DSBs non è omogenea: infatti sui cromosomi si differenziano zone ricche di DSBs, dette "hotspot" e zone povere di DSBs dette "coldspot". Un rapporto causale tra acetilazione istonica e DSB è stato trovato in *Schizosaccharomyces pombe*, dove la delezione del gene *GCN5*, codificante una acetiltransferasi istonica, determina la riduzione dei DSB in una regione "hotspot" contenente il locus *ade6* e la mutazione *M26* (Yamada *et al.*, 2004). Un'altra mutazione che in *S. cerevisiae* silenzia il gene *SIR2*, codificante per una deacetilasi istonica il cui substrato è H4K16, drasticamente altera la distribuzione nel genoma dei DSB, che aumentano per il 5% dei geni e diminuiscono per il 7% dei geni (Mieczkowski *et al.*, 2007). Sempre in *S. cerevisiae*, la deacetilasi istonica RPD3 agisce insieme alla metilasi istonica SET2P nel reprimere l'attività dell'hotspot HIS4 (Carrozza *et al.*, 2005; Keogh *et al.*, 2005). Anche mutazioni nel gene per la deacetilasi HDA1 elevano significativamente l'attività di questo hot spot (Merker *et al.*, 2008).

Un'altra analogia tra *mcc1* e *hda19* riguarda i difetti di segregazione e la formazione di prodotti meiotici sbilanciati. In oociti di topo il trattamento *in vitro* con Tricostatina A (TSA), che inibisce la deacetilazione istonica, causa errori nella segregazione dei cromosomi con aneuploidia e morte degli embrioni (Akiyama *et al.*, 2006). Anche negli oociti di suino il trattamento con TSA provoca, oltre ad un ritardo nell'ingresso in meiosi e formazione di ponti di cromatina, un'alta frequenza di cromosomi "lagging" in anafase I (Wang *et al.*, 2006).

Peculiare di *hda19* è la separazione prematura dei cromatidi fratelli. Una possibile ipotesi è che l'iperacetilazione induca alterazioni a livello della coesione tra i centromeri. Il centromero eucariotico è una struttura specializzata della regione cromosomica sulla quale si assembla il cinetocore, che, a sua volta, interagisce con i MT e dirige la segregazione dei cromosomi durante la mitosi e la meiosi (Morris *et al.*, 2007). È possibile distinguere due zone strutturalmente e funzionalmente differenti nel centromero: una parte più interna di cromatina centromerica (CEN), che assembla la struttura del cinetocore ed è fiancheggiata dall'eterocromatina pericentromerica che è responsabile della coesione dei cromatidi. In uomo e in *Drosophila* il pattern delle modifiche istoniche di queste due regioni è differente. Infatti l'eterocromatina pericentromerica è ipoacetilata sugli istoni H3 ed H4 ed è dimetilata sull'H3K9 nelle regioni immediatamente fiancheggianti il CEN. L'H3K9me3 caratterizza invece la regione di eterocromatina pericentromerica più distali (Sullivan and Karpen, 2004). Il CEN è caratterizzato dalla presenza di una variante istonica dell'H3 (in uomo la proteina centromerica A, CENP-A) che favorisce l'assemblaggio del cinetocore ed è dimetilata sulla lisina 4 dell'H3. Non presenta invece acetilazione della lisina 9 dell'H3 e delle lisine 5, 8, 12 e 16 dell'H4. Inoltre è assente la metilazione dell'H3K9 (Sullivan and Karpen, 2004).

Una nota funzione dell'eterocromatina pericentromerica è rappresentata dal reclutamento del complesso delle coesine che è richiesto per l'appropriata segregazione (Pidoux and Allshire, 2005) e le mutazioni che distruggono l'assemblaggio dell'eterocromatina aumentano la frequenza di aneuploidia (Morris *et al.*, 2007). Diverse evidenze esistono sul



ruolo della deacetilazione istonica nel controllo epigenetico dell'eterocromatina centromerica (Ekwall *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 2001; Cimini *et al.*, 2003; De La Fuente *et al.*, 2004). È stato visto che la deacetilazione istonica, seguita dalla metilazione dell'H3K9, è essenziale per il reclutamento della proteina eterocromatina 1 (HP1) al centromero dei cromosomi mitotici in *S. cerevisiae*, e nelle cellule somatiche di uomo e topo (Ekwall *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 2001). In accordo con questa osservazione, l'associazione di HP1 alla regione centromerica è indebolita in mitosi quando gli istoni sono mantenuti in uno stato iperacetilato durante la profase I (Cimini *et al.*, 2003). Recentemente è stato visto che HP1 gioca un ruolo più complesso a livello dell'eterocromatina centromerica. È stato infatti osservato che durante la meiosi HP1 recluta la proteina shugoshin, che protegge le coesine al centromero (Kitajima *et al.*, 2006). Yamagishi *et al.* (2008) hanno mostrato che, mentre l'arricchimento di coesine nelle regioni pericentromeriche è un requisito importante dell'eterocromatina per permettere la corretta segregazione dei cromosomi in mitosi, l'elemento cruciale in meiosi è rappresentato dal reclutamento e/o mantenimento di shugoshin al centromero. Anche le interazioni cinetocore-MT sembrano essere alterate quando l'eterocromatina centromerica ha una struttura meno condensata a causa della delezione di HP1 (Cimini *et al.*, 2003). In questo contesto molto complesso è coinvolta anche la chinasi Aurora B poiché, mediante la fosforilazione di H3S10, porta alla dissociazione di HP1 dalla cromatina (Fischle *et al.*, 2005; Hirota *et al.*, 2005) che è importante per la normale progressione della mitosi (Li *et al.*, 2006). La fosforilazione dell'H3S10 è associata alla deacetilazione dell'H3 nelle cellule mitotiche umane (Li *et al.*, 2006). È stato suggerito che HDA3 fornisca il substrato ottimale per la kinasi Aurora B deacetilando l'istone H3 (Li *et al.*, 2006). I mutanti *hda3* mostrano alterazioni nell'allineamento dei cromosomi, nell'interazione cinetocore-MT e collasso del fuso mitotico (Ishii *et al.*, 2008). Inoltre Eot-Houllier *et al.* (2008) hanno mostrato che la delezione di HDA3 determina l'acetilazione del centromero che impedisce la dimetilazione dell'H3K4 al centromero. La dimetilazione è importante per il legame di shugoshin che protegge le coesine dalla fosforilazione e quindi dalla protolisi operata dalla separasi, prevenendo la separazione precoce dei cromatidi. Ulteriori indagini potranno chiarire se si verifica in *hda19* iperacetilazione a livello centromerico e con quali effetti sulle altre modifiche istoniche cruciali per il funzionamento del centromero.

#### 4.3 Analisi dei geni HAT/HDAC identificati mediante indagini bioinformatiche

Nella presente tesi, l'analisi funzionale sistematica dei geni HAT/HDAC si è basata principalmente sull'impiego delle linee SALK. Questa strategia si è rivelata particolarmente laboriosa e non sempre in grado di garantire un avanzamento rapido della ricerca. Pur considerando che l'inattivazione del gene di interesse fosse da accertare nelle linee inserzionali, altri problemi si sono presentati per la scarsità del seme fornito dal NASC relativamente ad alcune linee, per l'inesattezza delle informazioni sullo stato genetico dell'inserzione, per l'assenza, in alcuni casi, dell'inserzione stessa. In un caso è stata anche rilevata la presenza di una doppia inserzione (*HAM1* ed *HAM2*). Per questi motivi il disegno sperimentale iniziale di analisi sistematica è stato implementato con un'analisi bioinformatica allo scopo di identificare geni candidati con un ruolo in meiosi sui quali approfondire le indagini. Le analisi bioinformatiche effettuate dal Dr. Aiese Cigliano R. (comunicazione personale) hanno individuato geni *HAT/HDAC* sovraespressi nei tessuti riproduttivi e recanti elevata similarità con geni orologi coinvolti nella riproduzione in altri organismi. Le analisi bioinformatiche hanno identificato quattro geni candidati: *HDA19*, *HDA6*, *HDA7* ed *HDA9*. Per quanto riguarda *HDA19* era già stato identificato nel primo screening delle linee inserzionali. Nel caso del gene *HDA9* non sono state condotte ulteriori analisi poiché la linea SALK a nostra disposizione aveva indicato l'assenza dell'inserzione. Le analisi delle linee corrispondenti ai geni *HDA6* ed *HDA7* non avevano

evidenziato fenotipi anomali. D'altra parte l'analisi RT-PCR ha evidenziato la presenza del trascritto del gene *HDA6* nella linea RNAi corrispondente. In questo caso l'assenza del fenotipo potrebbe dipendere da due fattori: la presenza di una quantità di trascritto sufficiente a garantire la funzione; la ridondanza funzionale con altre HDAC. È riportato che le proteine HDA6 ed HDA19 hanno profili di espressione molto simili (Schmid *et al.*, 2005) e sono coinvolte nella regolazione di molti processi comuni, probabilmente in maniera ridondante.

Nella linea SALK\_002912 corrispondente al gene *HDA7* l'inserzione ha causato una sovraespressione di questo gene. Anche in questo caso l'assenza del fenotipo può dipendere da ridondanza funzionale oppure dal fatto che la possibile ipoacetilazione istonica dovuta all'overespressione della deacetilasi non abbia effetti sulla fertilità.

#### **4.4 Dinamica delle modifiche istoniche nella meiosi di *Arabidopsis***

La dinamica delle modifiche istoniche è ben documentata nella meiosi femminile di diversi mammiferi (Gu *et al.*, 2010), mentre le informazioni relative alle piante sono piuttosto scarse. Nella presente tesi, esperimenti di immunolocalizzazione sono stati condotti allo scopo di ottenere un quadro di riferimento delle modifiche istoniche per l'acetilazione delle lisine (K) degli istoni H3 ed H4 e per la trimetilazione dell'H3K4 in relazione agli eventi della meiosi in *Arabidopsis thaliana*.

I risultati relativi all'immunolocalizzazione dell'H3K9K14ac sono indicativi dello stato globale dell'acetilazione dell'H3 che è risultata costantemente presente in tutte le fasi meiotiche osservate. Questo risultato concorda con quanto osservato in oociti di maiale da Wang *et al.* (2006), che riportano, comunque, l'andamento dell'acetilazione delle due lisine singolarmente (H3K14 ed H3K9). Tuttavia, il pattern di acetilazione in questo organismo è controverso. Bui *et al.* (2007), infatti, non osservano l'acetilazione per le lisine 9 e 14 negli stadi di metafase I e II, mentre Endo *et al.* (2005) riportano la deacetilazione in metafase I e II solo per la lisina 9. Negli oociti di topo, invece, entrambe le lisine sono acetilate fino al diplotene e, successivamente, restano deacetilate fino al termine della meiosi (Kim *et al.*, 2003). Nella presente tesi, inoltre, è stata osservata in zigotene un'acetilazione dell'H3 più debole a confronto con il segnale intenso delle fasi successive. Questo dato concorda con l'osservazione che il segnale dell'acetilazione dell'H3 in *Arabidopsis* diminuisce in zigotene (Boateng *et al.*, 2008). La riduzione dell'acetilazione nel corso della profase I sembra essere un requisito importante per la regolarità della meiosi. Infatti, nei mutanti *dsy10* (Boateng *et al.*, 2008) ed *ask1-1* (Yang *et al.*, 2006) la persistenza dell'acetilazione durante la profase I è stata associata a diversi difetti nell'appaiamento, sinapsi e ricombinazione. Anche nel mutante *mcc1* l'iperacetilazione dell'H3 in profase I è accompagnata da una serie di anomalie meiotiche (Perrella *et al.*, 2010).

L'acetilazione dell'H3K9 è presente sui cromosomi durante tutte le fasi della meiosi analizzate sebbene il segnale risulti molto più debole rispetto al diacetilato H3K9K14 e discordante per la localizzazione peculiare dell'H3K9ac nelle regioni organizzatrici del nucleolo (NOR) e nella zona perinucleolare. L'iperacetilazione dei NOR a livello, però, dell'istone H4 è stata riportata durante la mitosi in *Vicia faba* (Jasencakova *et al.*, 2000), in orzo (Wako *et al.*, 2005) e negli ibridi di *Arabidopsis*, in cui si ritiene che possa regolare l'espressione dei geni per l'rRNA, siti nei NOR (Early *et al.*, 2007). Tuttavia, i risultati ottenuti in questa tesi con l'anticorpo anti-H3K9ac, che riconosce anche elementi del citoscheletro, suggeriscono che tale anticorpo, peraltro ancora in fase sperimentale, sia aspecifico.

Per quanto riguarda l'istone H4, l'acetilazione avviene in *Arabidopsis* progressivamente su quattro lisine da K16, K12 e K8 fino a K5, riflettendo un pattern conservato negli eucarioti (Early *et al.*, 2007). Nella presente tesi entrambe K16 e K5 sono risultate acetilate durante tutte le fasi meiotiche indicando indirettamente la tetra-acetilazione dell'H4. L'acetilazione

di H4K16 è ritenuto un mark epigenetico importante per la regolazione della struttura della cromatina. Esperimenti *in vitro* hanno, infatti, dimostrato che H4K16ac interferisce con la formazione della fibra di cromatina di 30 nm inibendo la condensazione delle fibre cromatiniche (Shogren-Knaak *et al.*, 2006) e favorendo una configurazione "aperta" della cromatina. In base a questa evidenza si poteva supporre un andamento più dinamico dell'H4K16ac nel corso della meiosi di *Arabidopsis*. Negli altri organismi l'acetilazione dell'H4 evidenzia un pattern differente. Infatti, sia in topo sia in maiale l'acetilazione di K16 e K5 è assente in metafase I e II (Akiyama *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003; Endo *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006) suggerendo un possibile coinvolgimento nella condensazione dei cromosomi che è appunto maggiore negli stadi di metafase. In pecora, invece, H4K5 risulta acetilata solo in metafase I e anafase I (Tang *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda la trimetilazione dell'H3K4, essa è risultata stabile durante la meiosi di *Arabidopsis*. Questo risultato è in accordo con quanto riportato in lievito, dove la quantità globale di H3K4me3 non cambia durante le fasi della meiosi (Borde *et al.*, 2009). In topo, invece, la trimetilazione dell'H3K4 raggiunge un picco all'inizio della profase I (Kageyama *et al.*, 2007; Buard *et al.*, 2009). Inoltre, i risultati ottenuti nella presente tesi hanno indicato l'assenza dell'H3K4me3 dalle regioni eterocromatiche. Questo risultato non è sorprendente dato che la trimetilazione dell'H3K4 è ritenuta favorire la formazione dell'eucromatina (Kouzarides *et al.*, 2007). Inoltre, in riso (Li *et al.*, 2008) e in *Arabidopsis* (Lippmann *et al.*, 2004), i pattern delle modifiche istoniche a livello di eterocromatina ed eucromatina hanno indicato che i principali mark epigenetici discriminanti di questi due domini sono rappresentati proprio dalla quantità di H3K4me2 e H3K4me3 entrambi maggiori nell'eucromatina.

In conclusione, la metilazione istonica risulta abbastanza stabile nella meiosi dei diversi organismi mentre i pattern di acetilazione istonica sono differenti tra gli eucarioti. Nei mammiferi, tutte le lisine sono generalmente acetilate nella sottofase diplotene, in cui gli oociti si arrestano in attesa di segnali che ne determinano la maturazione. La ripresa della meiosi dopo l'arresto in profase I è accompagnata da una deacetilazione globale delle lisine dell'H3 e dell'H4. Si ritiene che tale deacetilazione, che persiste per tutta la meiosi in topo e bovino, possa contribuire al silenziamento trascrizionale, all'inibizione della replicazione ed a cancellare la memoria cellulare, pre-requisito per riprogrammare l'epigenoma degli oociti (Nagashima *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2003). Invece, in maiale e in pecora, la deacetilazione è seguita da una nuova fase di acetilazione per alcune lisine (Endo *et al.*, 2005; Tang *et al.*, 2007). In *Arabidopsis*, si osserva una presenza costante dell'acetilazione sugli istoni H3 ed H4 durante tutta la microsporogenesi. Le differenze osservate tra una specie vegetale e le specie animali possono dipendere dai diversi pattern di crescita e sviluppo. Infatti, a differenza degli animali, nelle piante la morfogenesi e la crescita continuano durante tutto il ciclo vitale ed esse, data la loro natura sessile, sono influenzate molto più degli animali dagli stimoli ambientali (Lusser, 2002). Di conseguenza, le cellule vegetali hanno sviluppato meccanismi molecolari particolari per il controllo della crescita e la regolazione dello sviluppo e, quindi, ci si potrebbe aspettare che anche alcuni aspetti della regolazione della struttura e funzione della cromatina siano peculiari di pianta. Inoltre, l'assenza di una vera dinamica per le modifiche istoniche analizzate non esclude che possano esserci variazioni non a livello globale, ma piuttosto locale. Le variazioni locali, che non possono essere rilevate con le tecniche di analisi impiegate in questa tesi, sono state osservate in lievito. Durante la meiosi in questo organismo la quantità di H3K4me3 non cambia significativamente a livello globale mentre l'analisi a livello di singole regioni indica una variazione quantitativa temporale (Borde *et al.*, 2009).

# **LMM DI MICROSPOROCITI DI POMODORO**

## **5. INTRODUZIONE**

### **5.1 Importanza economica del pomodoro**

Il pomodoro è una coltura ortiva appartenente alla famiglia delle *Solanaceae* il cui centro di origine si trova in sud America, nell'area compresa tra Cile settentrionale, Perù ed Ecuador. Tutte le varietà di pomodoro coltivato fanno parte della specie diploide *Solanum lycopersicum* (Knapp, 2002). Il pomodoro fu introdotto in Europa agli inizi del XVI secolo, inizialmente a scopi ornamentali, e solo alla fine del settecento si diffuse il suo impiego per l'alimentazione umana. Oggi il pomodoro è una delle specie ortive più diffuse a livello mondiale; dalle statistiche FAO del 2008 la superficie coltivata a pomodoro raggiunge i 5 milioni di ettari, con una produzione totale di 136 milioni di tonnellate. L'Italia è il sesto produttore al mondo con circa 6 milioni di tonnellate su una superficie di 115.000 ettari. La quantità di pomodoro inscatolato che l'Italia esporta è circa l'80% delle esportazioni mondiali (Fonte: *Global Trade Atlas*, 2005) e non meno importante è la produzione per il mercato fresco in cui le varietà italiane sono le direttrici commerciali in tutto il mondo. Il pomodoro costituisce una fonte importante di energia e di sostanze con nota azione benefica sulla salute incluse vitamine, minerali e sostanze antiossidanti (Davies and Hobson, 1981), rappresentate principalmente dal licopene, ma anche da beta-carotene (provitamina A), vitamina C, vitamina E e polifenoli/flavonoidi. Il pomodoro che oggi ritroviamo sulle nostre tavole è il risultato della selezione effettuata dagli agricoltori e dai "breeder" con programmi di miglioramento genetico. Il miglioramento genetico si basa sulla selezione di caratteri favorevoli e trova i suoi presupposti nella variabilità genetica. Una importante fonte di questa variabilità è rappresentata dalla ricombinazione meiotica che genera nuove combinazioni di alleli durante il processo di produzione dei gameti. Nonostante il potenziale applicativo, le conoscenze relative agli eventi molecolari della meiosi in pianta si giovano principalmente di quelle acquisite negli altri organismi. Tuttavia, negli ultimi anni, l'impiego di *Arabidopsis thaliana* come specie modello ha consentito l'identificazione e la caratterizzazione di circa 50 geni meiotici mediante strategie di "forward" e di "reverse genetics" (cfr 1.1). In pomodoro non sono disponibili le stesse conoscenze né gli stessi tool di *Arabidopsis*. Il pomodoro, oltre ad essere filogeneticamente distante dalle altre specie modello come riso, *Arabidopsis* e *Medicago truncatula*, non mostra elevata similarità con sequenze note di altre specie e ciò rappresenta un ostacolo agli approcci di "reverse genetics". Sebbene i mutanti spontanei di pomodoro siano stati collezionati per decenni, solo pochi geni sono stati finora isolati. A ciò si aggiunge la difficoltà di disporre di ampie popolazioni di mutanti indotti dovuta ad alcune caratteristiche di questa specie, tra cui le dimensioni della pianta, la durata del ciclo vitale e la minore efficienza dei metodi di trasformazione comunemente impiegati in *Arabidopsis* (Emmanuel and Levy, 2002). Di conseguenza anche le informazioni relative ai geni coinvolti nella meiosi in pomodoro sono piuttosto limitate (Stassen *et al.*, 1997; Havekes *et al.*, 1994; Lohmiller *et al.*, 2008). In questo contesto un notevole vantaggio sarà rappresentato dalla pubblicazione della sequenza completa e dai microarray rappresentativi dell'intero genoma che a breve dovrebbero diventare accessibili alla comunità scientifica.

### **5.2 Isolamento specifico di cellule mediante Laser Capture Microdissection (LCM)**

Gli organi delle piante sono strutture complesse costituite da differenti tessuti con distinti tipi di cellule. Ciascun tipo di cellula ha una funzione particolare che è diretta dai suoi unici trascrittomi, proteomi e metabolomi (Demura *et al.*, 2002). Gli approcci analitici tradizionali,

che utilizzano organi interi, possono mascherare le differenze tra le cellule nei livelli di RNA o proteine. Per questo motivo, sono stati utilizzati diversi approcci per prelevare specifici tipi di cellule dai tessuti vegetali. Il primo era rappresentato dall'uso di microcapillari (Karrer *et al.*, 1995) che si limitava alle cellule più superficiali, come cellule di guardia, epidermide e mesofillo fogliari, essendo difficile identificare specifici tipi cellulari al centro di un organo intatto (Brandt *et al.*, 2002). Su campioni biologici sezionati la Laser Assisted Microdissection (LAM) consente di isolare tessuti, cellule e perfino organelli e da questi estrarre acidi nucleici e proteine (Nelson *et al.*, 2006). E' applicabile a tutte le cellule che possono essere identificate istologicamente. Da quando è stata sviluppata nel 1996 (Emmert-Buck *et al.*, 1996), le applicazioni hanno riguardato in campo umano maggiormente gli eventi genetico-molecolari associati all'insorgenza di una determinata patologia, in particolare lo sviluppo tumorale, consentendo di identificare profili di espressione delle cellule tumorali, nuovi marker tumorali e nuove terapie. Tuttavia sono stati fatti significativi progressi nell'applicare la LAM anche ai tessuti vegetali e sono stati sviluppati protocolli per specie diverse, incluse riso, mais ed *Arabidopsis*. Esistono diversi sistemi LAM che si basano sull'impiego di strumenti combinati con un microscopio ottico, che di solito permette la visualizzazione del campione in campo chiaro, scuro o fluorescente. Tali sistemi sono varianti riconducibili ai due metodi di base per l'isolamento delle cellule "target": Laser Capture Microdissection (LCM) e Laser Excision. Quest'ultimo basato su "taglia e rimuovi" impiega di solito raggi laser UV per asportare i tessuti circostanti al target per fotodecomposizione (Burgemeister, 2005). Il laser impiegato ha una lunghezza d'onda leggermente più alta del picco di assorbimento delle proteine e degli acidi nucleici che per questo non dovrebbero essere danneggiati. Il campione così circoscritto, può essere raccolto con diverse tecniche. Nella tecnica del Laser Pressure Catapulting (LPC) il target tagliato è catapultato grazie ad una forte defocalizzazione dell'impulso laser in un contenitore di raccolta. La raccolta del campione può anche avvenire sfruttando la gravità, grazie ad un particolare tipo di supporto plastico di polietilenaftalato (PEN) su cui vengono adagate le sezioni. Il Laser Cutting ha il vantaggio di evitare contaminazioni grazie al fatto che durante il processo di taglio le cellule confinanti vengono distrutte (Cornea and Mungenast, 2002). Nella LCM, invece, le cellule target vengono "catturate" da una sezione di tessuto tramite una strategia di "fusione-fissaggio-estrazione". La sezione di tessuto viene ricoperta con un film polimerico termoplastico di etil-vinil-acetato (EVA) che riveste un "cap". Sotto l'effetto del laser (infrarosso) il film si espande e aderisce alla cellula/e di interesse. La dimensione del contatto tra il film ed il target può essere controllata agendo sulla messa a fuoco, la potenza, la durata e il diametro del raggio laser. Quando le cellule "target" aderiscono al film, il "cap" viene sollevato, raccogliendo con esse le cellule. Poiché le cellule "target" sono letteralmente "strappate" via da quelle circostanti, porzioni di cellule indesiderate possono aderire a quelle selezionate a seconda delle relative forze di contatto cellula/film, cellula/cella, cellula/vetrino. Tali forze dipendono dalla preparazione del tessuto e dalle caratteristiche intrinseche del tessuto stesso, ma una volta ottimizzato il protocollo di preparazione istologica e i parametri del laser per un particolare tessuto, la raccolta di materiale indesiderato è notevolmente ridotta, e comunque può essere limitata dal "blotting" con un nastro adesivo, o per asportazione usando raggi UV. Va sottolineato che sono stati sviluppati "cap" per LCM ad alta sensibilità per limitare i contatti del film solo alle cellule bersaglio. Accanto a questo, altri vantaggi della LCM, rispetto ad altre tecniche LAM, consistono nel fatto che la raccolta delle cellule target sul cap preserva le loro relazioni spaziali nella sezione originaria e questo, tra l'altro, ne facilita la verifica di qualità; inoltre, la maggior parte dell'energia del laser è assorbita dal film e non dal campione, rendendo improbabile che la sua composizione venga alterata dal laser. Infine, gli strumenti di ultima generazione realizzano una raccolta automatica delle cellule target, che possono essere identificate tramite software di analisi di immagine impostati sulle

caratteristiche morfometriche delle cellule bersaglio. Un importante prerequisito per la maggior parte delle applicazioni LAM è la capacità di ottenere buoni preparati istologici dei tessuti, che da un lato possano consentire l'identificazione del target, e dall'altro ne mantengano le macromolecole in uno stato suscettibile di estrazione. Occorre dunque, bilanciare tra la preservazione morfologica e il recupero degli acidi nucleici o delle proteine. I tre aspetti chiave per la preparazione di tessuti sono la fissazione, l'inclusione e la colorazione dei campioni. Lo scopo della fissazione è bloccare i processi biologici e preservare l'integrità del campione. I fissativi fanno ciò alterando la struttura dei componenti cellulari, processo che può influenzare l'integrità e l'estraibilità delle macromolecole. Vengono usati due tipi di fissativi chimici: fissativi "cross-linking" (aldeidi, formalina, etc.) che danno dettagli istologici superiori ma comportano una scarsa resa di acidi nucleici e proteine; e fissativi "coagulanti" (acetone, etanolo, etc.) che permettono dettagli istologici buoni mantenendo un recupero delle macromolecole discreto (Gillespie *et al.*, 2002). In alcuni casi il congelamento può essere un'alternativa alla fissazione chimica e, tramite inclusione in mezzo idoneo, i tessuti congelati sono sezionati con il criostato dando il migliore prodotto in termini di RNA. Sfortunatamente, però, il congelamento comporta svantaggi a livello dell'aspetto istologico del campione, a causa della difficoltà di stabilizzare il vacuolo centrale delle cellule vegetali durante il congelamento (Nelson *et al.*, 2006). Poiché quest'organello contiene enzimi lisosomiali e mantiene la pressione di turgore, una sua distruzione risulta in una drammatica perdita dell'integrità del tessuto. Di recente, diversi gruppi hanno modificato le procedure standard di criosezionamento per poterlo applicare alla preparazione di tessuti floematici di riso, embrioni agli stadi iniziali di sviluppo in *Arabidopsis*, tessuti epidermici e vascolari di mais; in quest'ultimo caso, i tessuti sono stati fissati prima del congelamento usando un crioprotettivo. Un'alternativa al congelamento è l'inclusione in paraffina, sebbene il recupero delle molecole biologiche è generalmente meno efficiente. Tuttavia, diversi lavori, partendo da sezioni istologiche di vari tessuti vegetali inclusi in paraffina e saggiando diversi metodi di fissazione e di estrazione di RNA, hanno concluso che l'LCM è di generale applicabilità per isolare specifiche cellule vegetali anche da tessuti inclusi in paraffina quali il mesofillo fogliare, il parenchima del peduncolo fogliare, il meristema della radice e del germoglio (Kerk *et al.*, 2003). Anche studi recenti in vari tessuti di *Arabidopsis*, inclusi i cotiledoni, hanno mostrato che l'uso di paraffina, in combinazione con fissativi coagulanti, dava una resa di RNA in qualità e quantità sufficiente per analisi di RT-PCR e microarray (Kerk *et al.*, 2003). L'altro parametro critico, dopo la fissazione e l'inclusione, è rappresentato dalla colorazione che può essere effettuata con differenti colorazioni istologiche. Poiché i coloranti, interagendo con i componenti cellulari come DNA/RNA, possono interferire con il recupero degli acidi nucleici ed, in particolare, dell'RNA, vari studi hanno esaminato gli effetti delle colorazioni nucleari sul recupero e sulla successiva amplificazione degli acidi nucleici (Ehrig *et al.*, 2001). I coloranti come ematossilina, "methyl green", toluidina (blue O) e "azure B" danno risultati soddisfacenti sia per quanto riguarda i dettagli istologici che per il recupero e successivo utilizzo degli acidi nucleici (Huang *et al.*, 2002).

### 5.3 Applicazioni della tecnologia LCM

In campo umano la tecnologia LCM ha dato importanti contributi alla diagnosi di varie infezioni e alla comprensione dei meccanismi genetico-molecolari di diverse patologie come carcinomi, aterosclerosi, morbo di Alzheimer e sclerosi multipla (Ohyama *et al.*, 2002). Nelle piante l'LCM è stata applicata principalmente per lo studio dei profili di trascrizione specifici per tipo di cellula (Nelson *et al.*, 2006) combinandosi con diversi metodi tra cui "microarray", analisi seriale dell'espressione genica (SAGE) (Datson *et al.*, 1999), "454-sequencing cDNA" (Margulies *et al.*, 2005).

Lo studio dei profili trascrizionali ha mostrato che centinaia di trascritti sono espressi differenzialmente tra cellule specializzate e possono essere specifici solo di uno o pochi tipi cellulari (Honys and Twell, 2003; Birnbaum *et al.*, 2003). Ad esempio, profili trascrizionali del polline in maturazione di *Arabidopsis* mostrano che circa 650-850 trascritti sono specificamente espressi nel polline, a diversi stadi di sviluppo, a confronto con i profili di altri organi dello sporofito (Honys and Twell, 2004). Tessuti vascolari raccolti da coleptili di mais tramite LCM evidenziano che il 3% dei trascritti è espresso preferenzialmente nei tessuti vascolari a confronto con cellule epidermiche (Nakazono *et al.*, 2003). Utilizzando l'approccio LCM-microarray, su cellule di radici di soia (Klink *et al.* 2007) e pomodoro (Portillo *et al.*, 2009) infettate da nematodi sono state identificati geni differenzialmente espressi nelle cellule infette.

L'analisi dei profili di espressione delle cellule meiotiche risulta complicata dall'eterogeneità dei tessuti in cui esse sono immerse. Tale analisi, finora, è stata condotta utilizzando stami o bocci fiorali contenenti miscele dei diversi tipi di cellule. In questo contesto i geni rilevanti per la meiosi erano individuati confrontando l'espressione di diversi stadi di sviluppo dell'antera. Ad esempio Lu *et al.* (2006), in riso, hanno dissezionato gli stami a vari stadi di sviluppo e ne hanno confrontato i profili trascrizionali. L'analisi microarray ha indicato 26 geni preferenzialmente espressi durante lo sviluppo precoce degli stami e quindi, presumibilmente, coinvolti in meiosi. Ma *et al.* (2008) hanno effettuato l'analisi microarray a 7 diversi stadi di sviluppo dell'antera in mais, corrispondenti agli stadi da pre-meiosi a polline maturo, ottenendo 234 geni correlati allo stadio pre-meiotico. In questo contesto l'LCM ha apportato notevoli vantaggi consentendo di isolare microsporociti in *Arabidopsis thaliana* (Barra, 2008) ed in riso. Ad esempio, in quest'ultimo tramite LCM e microarray sono stati individuati 1158 geni differenzialmente espressi nelle cellule madri del polline a confronto con le cellule di polline tri-nucleato (Tang, 2010).

#### **5.4 Scopi e contenuti della tesi**

Lo scopo era quello di definire una metodologia di LMM (Laser Microdissection Microarray) per l'isolamento di geni meiotici in *Solanum lycopersicum*, con particolare interesse per quelli responsabili dell'acetilazione/deacetilazione istonica. La finalità di lungo periodo è quella di comprendere i meccanismi molecolari che regolano gli eventi riproduttivi legati alla produzione quali-quantitativa in questa specie di interesse agrario.

In questa tesi è stata messa a punto la tecnica Laser Capture Microdissection (LCM) per isolare in maniera specifica le cellule madri del polline (microsporociti) e le microspore in combinazione con l'analisi microarray. Le analisi di confronto dei profili trascrizionali dei microsporociti e delle microspore hanno evidenziato 631 geni differenzialmente espressi, di cui 268 specifici (112 geni) o up-regolati (156 geni) nei microsporociti. Sebbene le informazioni relative al genoma di pomodoro siano scarse, i risultati ottenuti hanno indicato la presenza di geni riconosciuti come meiosi-specifici e l'assenza di contaminazioni dovute al tessuto somatico. Inoltre, tra i geni specifici dei meiociti, sono state identificate 2 deacetilasi istoniche. Dunque la tecnica LCM combinata ai microarray si è dimostrata valida per il "transcription profiling" dei microsporociti in pomodoro. Il lavoro di tesi si è svolto presso l'Istituto CNR di Genetica Vegetale di Portici, per quanto riguarda la preparazione e l'analisi delle sezioni istologiche. Gli esperimenti di LCM e Microarray sono stati svolti presso il laboratorio Gene Core Expression (GE.CO.) in collaborazione con il Dott. P. De Luca del Centro di Ricerche Genetiche IRGS, Biogem, di Ariano Irpino (AV). Questa parte del lavoro di tesi di dottorato è stata finanziata dal progetto MIUR Genopom.

## **6. MATERIALI E METODI**

### **6.1 Materiale genetico**

Le piante di pomodoro (*Solanum lycopersicum* cv M82) sono state allevate in camera di crescita (22-24°C) nella fase di germinazione e di plantula e successivamente trapiantate in serra. Bocci fiorali di diverse dimensioni sono stati raccolti per correlare lo stadio di sviluppo del fiore alla fase meiotica dei microsporociti. I bocci fiorali raccolti sono stati immediatamente fissati come descritto nel paragrafo 6.2.1. I bocci fiorali impiegati nell'analisi LMM sono stati raccolti da tre repliche biologiche, per ciascun tipo di cellula (microsporocita vs microspora).

### **6.2 Isolamento dei microsporociti**

#### *6.2.1 Preparazione istologica delle infiorescenze*

La preparazione delle criosezioni mediante inclusione dei tessuti in TissueTek O.C.T. (Miles Inc, IN, USA) è stata effettuata seguendo il protocollo di Nakazono *et al.* (2003) con le seguenti modifiche: il tempo di fissazione in Carnoy è stato di 6 ore e la soluzione crioprotettiva di saccarosio è stata preparata con l'RNA Later (Qiagen, CA, USA).

I tessuti sono stati sezionati a 10 µm con il criostato CM1850 (Leica, Germania) e montati sui vetrini SuperFrost Plus (Menzel GmbH & Co KG, Germania). Le sezioni criosezionate sono state mantenute a -80°C. Per l'eliminazione dell'O.C.T. e la disidratazione delle sezioni congelate, i campioni sono stati trattati con 2 passaggi successivi in etanolo 70% (v/v), uno in H<sub>2</sub>O-DEPC, due in etanolo 95% (v/v), due in etanolo 100% (v/v), ed uno in xilene per 10 min. I trattamenti in etanolo erano di 20 sec., mentre quelli in H<sub>2</sub>O-DEPC erano di 60 sec. Le sezioni sono state mantenute a temperatura ambiente fino al loro uso per LCM (max entro 2 ore).

#### *6.2.2 Colorazione delle sezioni istologiche*

Per l'identificazione dello stadio meiotico le criosezioni sono state trattate con il fluorocromo 4'-6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI). Tali sezioni sono state usate solo per la verifica dello stadio meiotico, mentre quelle usate per la cattura non sono state colorate.

#### *6.2.3 Laser Capture Microdissection (LCM)*

Per l'isolamento dei microsporociti e delle microspore è stato usato il sistema PixCell II LCM (Arcturus, CA, USA). I parametri del raggio laser utilizzati sono stati i seguenti: diametro di 15 µm, potenza di 100 mW e durata dell'impulso di 1,8 ms. Ogni impulso laser ha consentito la cattura di una microspora, mentre 1 o più impulsi sono stati necessari per catturare i microsporociti, data la loro maggiore dimensione. Le cellule somatiche sono state rimosse con l'uso del CapSure® Clean-up pads (Arcturus, CA, USA) secondo le procedure indicate dalla casa produttrice.

### **6.3 Estrazione dell' RNA**

L'RNA totale è stato estratto dai campioni LCM utilizzando il PicoPure® RNA Isolation Kit (Arcturus, CA, USA) seguendo il protocollo della casa produttrice. L'integrità dell'RNA



estratto è stata valutata mediante Bioanalyser 2100 Agilent utilizzando la “New Series II RNA 6000 assays” (RNA 6000 pico assay kit) (Agilent Technologies, CA, USA).

## **6.4 Analisi Microarray**

Le procedure di amplificazione, ibridazione ed analisi dei dati microarray sono state condotte dal gruppo del Dott. P. De Luca presso il centro di ricerche genetiche Biogem (Ariano Irpino, AV), e sono di seguito riassunte.

### *6.4.1 Amplificazione RNA e ibridazione*

L'RNA è stato amplificato e marcato seguendo le procedure indicate dal “Two-Cycle Eukaryotic Target Labelling Assay” descritte nel Gene Chip Expression Analysis Technical Manual. Partendo da una quantità iniziale di RNA totale pari a 50 ng. 15µg di cRNA marcato e frammentato sono stati utilizzati per l'ibridazione del “GeneChip Tomato Genome”, Affymetrix (Santa Clara, CA, USA).

### *6.4.2 Analisi dei dati e classificazione funzionale dei geni*

I file DAT sono stati analizzati con il programma GCOS 1.4 (Affymetrix Inc.) normalizzando i dati mediante l'algoritmo “Robust Multialignment Algorithm” (RMA). I valori di espressione ottenuti sono stati analizzati usando il programma GeneSpring 7.3 (Agilent Technologies, USA) ed i risultati sono stati filtrati selezionando i geni con un “Relative Quantification” > 1,5.

Il calcolo degli indici di arricchimento delle classi geniche annotate in Gene Ontology (GO) ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) è stato effettuato utilizzando il programma GOEAST (Gene Ontology Enrichment Analysis Software Tool kit, <http://omicslab.genetics.ac.cn/goeast>) usando il test statistico di Fisher ed un valore di  $p < 0,01$ .

## **6.5 Analisi Real Time-PCR quantitativa**

L'analisi Real Time-qPCR è stata condotta mediante impiego del termociclatore Corbett Rotor-Gene (Qiagen, Hilden, Germany). Per l'amplificazione sono stati utilizzati il cDNA, ottenuto da 1 µg di cRNA dei microsporociti tramite il kit Superscript<sup>TM</sup> II RNase H reverse transcriptase con il poly(dT) primer (Invitrogen, CA, USA) ed il kit “Platinum<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green qPCR SuperMix-UDG with ROX” (Invitrogen, CA, USA). La reazione di amplificazione ha utilizzato il cDNA ottenuto diluito 1:10. I primer sono stati disegnati utilizzando il software ABI Prism Primer Express (versione 2.0) (Applied Biosystems, CA, USA). I dati di espressione sono stati analizzati con il software “Rotor-Gene 6000 Series Software”. In particolare, utilizzando come controllo endogeno l'amplicone per la fosforibosil-adenosina transferasi 1 (*APT1*) che permette di normalizzare la quantità di mRNA del gene target, e il cDNA estratto da microspore come calibratore, è stato possibile calcolare l'indice “Relative Quantification” (RQ) che quantifica i livelli di trascritto del gene considerato.

**Tabella 11:** Primer utilizzati negli esperimenti di Real Time-qPCR

Gene	Nome primer	Sequenza primer
dehydroascorbate reductase	BI91_F	5' – GCATCTCAAGGCTCATGGACC – 3'
	BI91_R	5' – GAGCCACCTCGAGATGGTACA – 3'
nodulin MtN3 family protein	AJ63_F	5' – TGATGCCTACATTCTCGCACC – 3'
	AJ63_R	5' – CCTCTCTTGCTGCCATCTGTCT – 3'
clathrin binding protein-like	AK77_F	5' – CTTTTGGCCGAGGCTATTCA – 3'
	AK77_R	5' – GCCTTGGCATTCTCCTTCTGA – 3'
auxin-binding protein 1	AK83_F	5' – CCCCCTTAATGATGTACACCAG – 3'
	AK83_R	5' – CAGCTGTGTGTGGCATCGAC – 3'
histone deacetylase	AK74_F	5' – AAGGCCTAAACCACGGATATGG – 3'
	AK74_R	5' – TGGTCGTCCACATCCCTCAT – 3'
fosforibosil-adenosina transferasi 1 (APT 1)	APT_F	5' – TGCATGTAGGTGCTGTGCAAG – 3'
	APT_R	5' – ACGCTCAAGAAGCCTAATCGC – 3'

## 7. RISULTATI E DISCUSSIONE

Nelle presente tesi è stata applicata la tecnica Laser Microdissection Microarray (LMM) nella specie di interesse agrario *Solanum lycopersicum*. Questo approccio ha lo scopo di identificare geni specificamente espressi durante la meiosi, mediante confronto tra le cellule madri del polline (microsporociti) nello stadio pre-meiotico/meiotico e le microspore nello stadio uni- e bi-nucleato. Tale studio è motivato da due considerazioni in ambito applicativo: 1) le implicazioni che la migliore conoscenza molecolare del sistema riproduttivo può avere nel miglioramento genetico del pomodoro e 2) la consapevolezza che la funzionalità dei meccanismi riproduttivi è determinante per ottenere produzioni quali-quantitative stabili.

Il risultato di questa parte del lavoro è rappresentato dalla definizione della tecnica Laser Capture Microdissection (LCM) in pomodoro (cv M82), dall'isolamento di meiociti e di geni specifici della meiosi. Di seguito si presentano in dettaglio i risultati attinenti ogni aspetto.

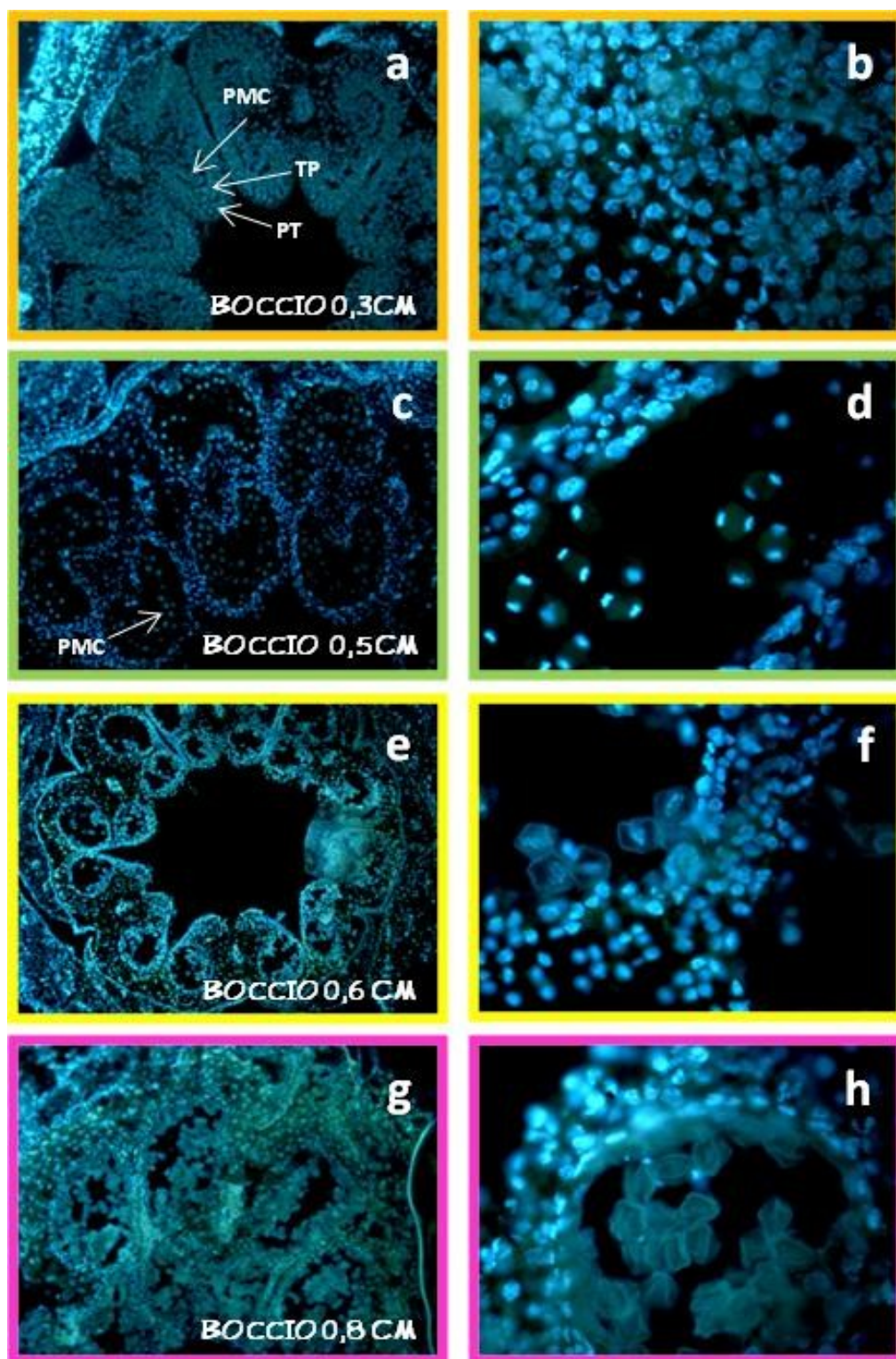
### 7.1 Analisi istologica dei bocci fiorali di pomodoro

Allo scopo di prelevare le cellule di interesse è stata identificata la dimensione dei bocci fiorali (Fig 11) a cui corrispondeva la microsporogenesi e la microgametogenesi visualizzate tramite analisi cito-istologiche delle antere. In pomodoro le antere sono bilobate e ciascun lobo consiste di due loculi fusi lateralmente (Riggs *et al.*, 2001). Ciascuna antera consiste di 3 tessuti di base: il più esterno è fatto da diversi strati di cellule che sono complessivamente chiamate "cellule della parete" ed hanno funzione di supporto strutturale. Le cellule più interne dell'antera comprendono il tessuto sporigeno, dove le cellule madri del polline effettuano la meiosi e sviluppano il polline maturo. Intorno al tessuto sporigeno ci sono uno o due strati di cellule che sono complessivamente definite "tappeto". Esse hanno una funzione nutritiva e producono enzimi implicati nello sviluppo del polline (Riggs *et al.*, 2001). Mediante osservazione di sezioni trasversali colorate con DAPI è risultato che i bocci di dimensione 0,3 e 0,5 cm contenevano microsporociti rispettivamente nello stadio pre-meiotico e meiotico (Fig 12 a-d) mentre i bocci di 0,6 e 0,8 cm contenevano microspore uni-nucleate e granelli pollinici bi-nucleati (Fig 12 e-h). Nelle antere in pre-meiosi (Fig 12 a) le cellule dei vari tessuti sono differenziate e si distinguono 4 logge al cui interno sono visibili i meiociti. Nelle fasi successive le antere si sviluppano aumentando in dimensione, sono visibili i microsporociti isolati e successivamente le microspore insieme al tappeto in degenerazione.

**Figura 11:** Morfologia dei bocci di pomodoro (cv M82) a diversi stadi di sviluppo



**Figura 12:** Stadio di sviluppo delle antere (a, c, e, g) e stadio pre-meiotico (b), meiotico (d) e post-meiotico (f, h) in pomodoro (cv M82). Nelle antere corrispondenti ai bocci di 0,3 cm (a) sono visibili tre strati di cellule corrispondenti alla parete (più esterno, PT), tappeto (centrale, TP) e tessuto sporigeno con le cellule madri del polline in pre-meiosi (più interno, PMC). Le antere dei bocci di 0,5 cm (c), 0,6 cm (e) e 0,8 cm (g) contengono PMC in meiosi (d), microspore uni-nucleate (f) e polline (h).



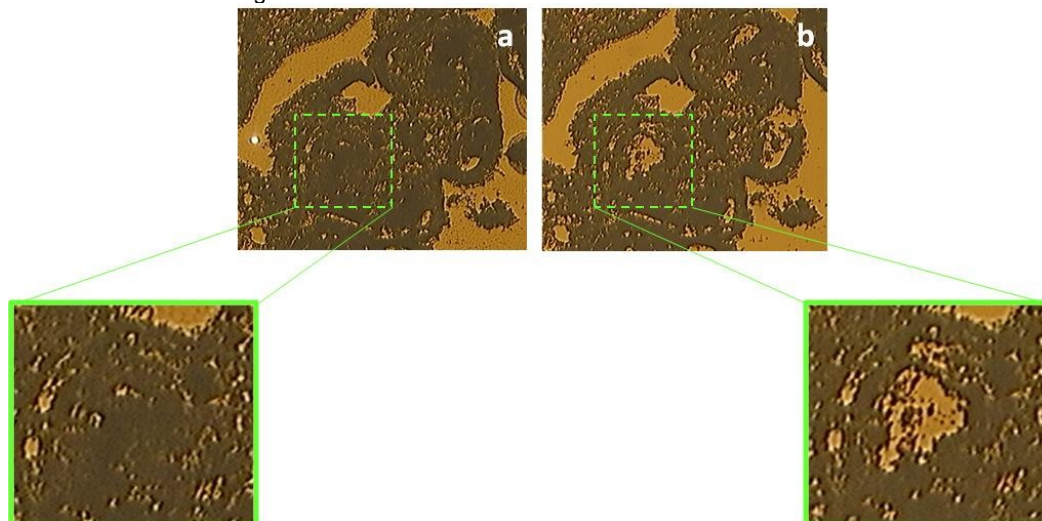
## 7.2 Preparazione dei tessuti per LCM

La preparazione istologica delle infiorescenze della cv M82 da sottoporre ad LCM è stata effettuata con il metodo della criosezione che prevede l'inclusione del materiale in un mezzo di congelamento (O.C.T.) previa fissazione. È riportato che, nelle cellule somatiche, il criosezionamento garantisce migliori risultati in termini di resa in RNA rispetto al metodo dell'inclusione in paraffina (Huang *et al.*, 2002). Inoltre, esperimenti precedenti, condotti presso il nostro laboratorio su infiorescenze di *Arabidopsis*, hanno mostrato che il metodo della criosezione ha anche il vantaggio di ridurre i tempi di processamento dei campioni (Barra L., 2008). Come in *Arabidopsis*, nella fase di fissazione è stato impiegato l'RNA Later (Qiagen) necessario per stabilizzare l'RNA.

## 7.3 Cattura dei microsporociti tramite LCM

Nella tecnica LCM una cattura efficiente delle cellule bersaglio deve tendere ad annullare le contaminazioni di cellule indesiderate (Fig 13). Nel caso dei microsporociti, le contaminazioni sono rappresentate dalle cellule somatiche del tappeto. Per ottenere un isolamento senza cellule contaminanti sono stati perciò utilizzati diversi parametri del raggio laser per il diametro, la durata e la potenza. Il diametro serve a garantire una cattura specifica delle cellule di interesse, mentre la durata e la potenza influiscono sull'efficienza di isolamento ed il recupero delle cellule bersaglio separandole dai tessuti circostanti. I parametri ottimali individuati per la cattura dei microsporociti e delle microspore nelle antere di pomodoro sono stati i seguenti: diametro=15mm; potenza=100mW; durata=1,8ms.

**Figura 13:** Sezione di antera di pomodoro prima (a) e dopo (b) la cattura dei microsporociti. L' area interessata dalla cattura è mostrata nell'ingrandimento.



## 7.4 Quantità, qualità e specificità dell'RNA

Per determinare il numero di microsporociti e microspore da isolare per ottenere quantità di RNA sufficienti per l'analisi microarray sono stati condotti esperimenti pilota di estrazione e quantificazione dell'RNA. I risultati hanno indicato che era necessario catturare almeno 2000 cellule per ottenere quantità di RNA sufficiente (5-6ng/μl) per le analisi successive.

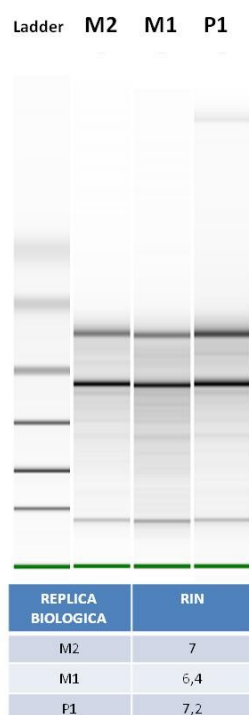


Per l'esperimento finale sono state allestite tre repliche biologiche per ciascun tipo cellulare da confrontare (microsporocita vs microspora). Sono stati "catturati" complessivamente oltre 10000 microsporociti e 6500 microspore, dai quali è stata estratta una quantità di RNA pari a 305 ng e 346 ng totali, rispettivamente. Prima di procedere all'amplificazione, la qualità dell'RNA estratto è stata valutata in base al parametro "RNA Integrity Number" (RIN). Tale analisi, condotta mediante corsa elettroforetica su Bioanalyzer 2100 (Agilent) ha indicato valori di RIN sufficienti per le applicazioni successive. Nella figura 14 si riporta il risultato della verifica della qualità dell'RNA ottenuto per 3 delle 6 repliche biologiche. I risultati ottenuti per ciascuna replica biologica sono riportati in tabella 12.

**Tabella 12:** Numero di impulsi laser, quantità di RNA e RNA Integrity Number (RIN) per ciascuna delle tre repliche biologiche dei microsporociti (M1, M2 ed M3) e delle microspore uni-/bi-nucleate (P1, P2 e P3).

Replica biologica	N. Impulsi Laser	Quantità RNA (ng)	RIN
M1	4088	80	6,4
M2	3419	100	7
M3	2732	125	7,4
P1	2480	96	7,2
P2	2054	88	6,4
P3	2063	163	6,4
TOT	16836	652	

**Figura 14:** Immagine del "gel" virtuale ottenuta con Bioanalyser 2100 (Agilent) dell'RNA estratto da due campioni di microsporociti (M1, M2) ed un campione di microspore (P1) catturati con LCM.



## 7.5 Amplificazione dell'RNA ed analisi Microarray

L'amplificazione dell'RNA totale dei microsporociti e delle microspore isolati mediante LCM e l'analisi microarray sono state realizzate *in service* presso il laboratorio del Dott. P. De Luca del centro di ricerche genetiche Biogem (Ariano Irpino, AV). Per l'amplificazione è

stato utilizzato il kit “Two-Cycle cDNA Synthesis Kit, Affymetrix, MEGAscript T7, Ambion”, partendo da una quantità iniziale di RNA pari a 50 ng. Dopo il secondo ciclo di amplificazione la resa media dell'RNA è stata di 47 µg per i microsporociti e 62,5 µg per le microspore. Considerando che l'RNA poly(A+) rappresenta l'1% dell'RNA totale (Sugiura and Takeda, 2000), si può stimare un'amplificazione pari ad oltre 90000 e 120000 volte per l'RNA dei microsporociti e delle microspore (Tab 13).

**Tabella 13:** Resa dell'RNA amplificato dai microsporociti e dalle microspore catturati con LCM

Tipo cellulare	N. cellule	Resa RNA totale (ng)	RNA iniziale (ng)	Secondo ciclo amplificazione	
				Resa mRNA (µg)	Amplificazione (*)
meiociti	~ 10000	305	50	47	94000
microspore	~ 6600	346	50	62,5	125000

(\*) L'RNA poly(A+) è l'1% dell'RNA totale (Sugiura and Takeda, 2000)

L'RNA ottenuto da questa amplificazione è stato quindi utilizzato per l'ibridazione su “GeneChip Tomato Genome Affymetrix” che contiene 10038 sonde rappresentative di 9254 trascritti. La scelta del chip Affymetrix è stata motivata da parte del Servizio Biogem con l'affidabilità dei dati che garantiscono la rappresentatività della reale situazione biologica. Infatti, tutti i chip Affymetrix contengono un set di oligonucleotidi cosiddetti “mismatch”, che duplicano sequenze già presenti sul vetrino ma con una base azotata errata al centro della sequenza. In questo modo è possibile normalizzare il segnale di fondo e correggere gli errori causati da ibridazioni aspecifiche.

Dall'analisi t-test ( $p < 0,05$ ) dei dati normalizzati e filtrati (Relative Quantification,  $RQ > 1,5$ ) è risultato che 631 geni sono differenzialmente espressi: tra questi 112 sono specifici dei microsporociti e 129 sono specifici delle microspore. Dei restanti 390 geni, espressi sia nei microsporociti che nelle microspore, 156 sono risultati up-regolati nei microsporociti. I 112 geni meiosi-specifici (Tab. 14) e i 156 geni up-regolati (Tab. 15) in meiosi sono stati analizzati utilizzando il software di analisi BLAST2GO ([www.blast2go.org](http://www.blast2go.org)), che consente l'annotazione funzionale dei geni. Nel caso in cui l'annotazione automatica non consentiva l'identificazione dei corrispettivi omologhi, le sequenze sono state annotate manualmente utilizzando diversi algoritmi di allineamento BLAST e successiva interrogazione della banca dati UniGene. I risultati relativi all'annotazione sono riportati in tabella 14. Tra i suddetti geni, sono evidenziati il gene *meiotic serine proteinasi*, che è riconosciuto essere espresso durante la meiosi di pomodoro ed il gene *rad51* che ha un ruolo nella ricombinazione meiotica. Inoltre, un gene riconosciuto come specifico del tappeto, *TOMA108* (Xu *et al.*, 2006), non è stato rilevato dalla presente analisi, né a livello di microsporociti né a livello di microspora, confermando la specificità dei tipi di cellule ‘catturate’ e quindi dell'RNA ottenuto. Infine sono evidenziati due geni codificanti per deacetilasi istoniche espressi specificamente nei microsporociti e dunque putativamente coinvolti nella meiosi di pomodoro.

**Tabella 14:** Geni espressi nei microsporociti in maniera specifica. Sono evidenziati i geni meiotici *meiotic serine proteinase* e *rad51*. (Cont.)

Probe Set ID	Descrizione del gene
Les.103.1.S1_at	cyclin a-like protein
Les.104.1.S1_at	cyclin b2
Les.1238.1.S1_at	glycosyl transferase family 1 protein
Les.1380.1.A1_at	---NA---
Les.1569.1.S1_at	unknown protein
Les.1718.1.A1_at	---NA---
Les.1835.1.S1_at	strictosidine synthase
Les.1879.1.A1_at	---NA---
Les.1899.1.A1_at	---NA---
Les.1912.1.A1_at	---NA---
Les.1925.2.S1_at	dehydroascorbate reductase
Les.1934.1.A1_at	---NA---
Les.2017.1.A1_at	---NA---
Les.2262.1.A1_at	---NA---
Les.2453.1.S1_at	---NA---
Les.2528.1.A1_at	---NA---
Les.2659.1.S1_at	lactosylceramide 4-alpha-
Les.2659.2.A1_at	---NA---
Les.2729.1.A1_at	---NA---
Les.2729.2.S1_at	bzip transcriptional activator
Les.2944.3.S1_at	tubulin beta-2
Les.3193.1.S1_at	cytoplasmic dynein light
Les.3330.3.A1_at	fasciclin-like arabinogalactan protein
Les.3462.1.S1_at	af181496_1meiotic serine proteinase
Les.3487.1.S1_at	1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase
Les.3491.1.S1_at	endo-beta- -glucanase
Les.3560.1.S1_at	extensin-like protein
Les.3563.1.S1_at	auxin-binding protein
Les.3638.1.S1_at	vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog
Les.3663.1.S1_at	development-specific protein
Les.3781.1.S1_at	p27kip1-related-protein 1
Les.3831.1.S1_at	---NA---
Les.4058.1.S1_at	---NA---
Les.411.1.S1_at	---NA---
Les.4365.1.S1_at	glycerol-3-phosphate acyltransferase
Les.4490.1.S1_at	chaperone protein dnaJ-related
Les.4605.1.S1_at	---NA---
Les.4613.1.S1_at	protein kinase
Les.468.1.S1_at	histone deacetylase
Les.468.2.S1_at	histone deacetylase
Les.4710.1.S1_at	phosphoethanolamine n-
Les.4711.1.S1_at	transcription factor
Les.4723.1.S1_at	---NA---
Les.4731.1.S1_at	dna binding
Les.4782.1.S1_at	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase 3
Les.4832.1.S1_at	---NA---
Les.4883.1.S1_at	armadillo beta-catenin repeat family protein
Les.4893.1.S1_at	ubiquitin-conjugating enzyme
Les.5123.1.S1_at	PREDICTED: hypothetical protein [Vitis vinifera]
Les.5194.1.S1_at	---NA---
Les.5198.1.S1_at	hypothetical protein [Ricinus communis]
Les.5205.1.S1_at	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1
Les.5217.1.S1_at	aspartyl protease family protein
Les.5220.1.S1_at	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
Les.5244.1.S1_at	zinc finger
Les.5314.1.S1_at	methyltransferase family



Tab 14: Cont.

Probe Set ID	Descrizione del gene
Les.5333.1.S1_at	serine-threonine protein plant proteinase
Les.5358.1.S1_at	plant synaptotagmin
Les.5369.1.S1_at	prolyl 4-hydroxylase alpha
Les.5382.1.S1_at	atp binding
Les.5437.1.S1_at	hypothetical protein
Les.5461.1.S1_at	rho gdp-dissociation
Les.5465.1.S1_at	transcription initiation factor iif subunit
Les.5498.1.S1_at	short-chain dehydrogenase reductase family protein
Les.5579.1.S1_at	---NA---
Les.5600.1.S1_at	heat shock factor
Les.5648.1.S1_at	cysteine proteinase precursor
Les.5678.1.S1_at	integral membrane family protein
Les.5757.1.S1_at	dna ligase
Les.5793.1.S1_at	predicted protein [Populus trichocarpa]
Les.5930.1.S1_at	af416732_1 short-chain type alcohol dehydrogenase
Les.614.1.A1_at	---NA---
Les.738.1.S1_at	protein kinase chloroplast
Les.812.1.S1_at	inducer of cbf expression
Les.89.1.S1_at	rad51_sollc ame: full=dna repair protein rad51 homolog
Les.95.1.S1_at	integral membrane single c2 domain protein
Les.98.1.S1_at	mar-binding filament-like protein 1
LesAffx.11856.1.S1_at	cell division protein
LesAffx.12150.1.A1_at	cinnamoyl- reductase 1
LesAffx.1222.1.S1_at	zinc finger (c3hc4-type ring finger) family protein
LesAffx.24958.1.S1_at	Os07g0159700 [Oryza sativa Japonica Group]
LesAffx.2840.2.S1_at	60s acidic ribosomal protein p3
LesAffx.2889.3.S1_at	organic anion
LesAffx.2889.4.S1_at	nst-k1 (nucleotide sugar transporter-kt 1)
LesAffx.3253.1.S1_at	abscisic acid 8 -hydroxylase
LesAffx.36884.1.S1_at	---NA---
LesAffx.37475.1.S1_at	shrunk seed protein
LesAffx.37692.1.S1_at	copper transporter
LesAffx.38499.1.S1_at	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
LesAffx.41316.1.S1_at	isco activase protein
LesAffx.44821.1.S1_at	f-box lrr-repeat
LesAffx.45975.1.S1_at	predicted protein [Populus trichocarpa]
LesAffx.46206.1.S1_at	cov1-like protein
LesAffx.51046.1.S1_at	cbl-interacting serine threonine-protein
LesAffx.51318.1.S1_at	conserved hypothetical protein [Ricinus communis]
LesAffx.55723.1.S1_at	nonspecific lipid-transfer protein
LesAffx.55779.1.S1_at	clathrin binding
LesAffx.58019.1.S1_at	ripening-related protein-like
LesAffx.58097.1.S1_at	protein kinase chloroplast
LesAffx.60146.2.S1_at	non-imprinted in prader-willi angelman syndrome region
LesAffx.61000.1.S1_at	hypothetical protein
LesAffx.61901.1.S1_at	patatin t5
LesAffx.62458.1.S1_at	dihydroflavonol 4-reductase family
LesAffx.62570.2.S1_at	---NA---
LesAffx.64369.1.S1_at	galactosyltransferase family protein
LesAffx.65733.1.S1_at	predicted protein [Populus trichocarpa]
LesAffx.66532.1.S1_at	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
LesAffx.68854.1.S1_at	protein binding
LesAffx.70078.1.S1_at	gtp-binding protein
LesAffx.70525.1.S1_at	Unknown gene [Vitis vinifera]
LesAffx.70712.1.S1_at	histone h1f
LesAffx.71608.1.S1_at	hypothetical protein [Vitis vinifera]

**Tabella 15:** Geni sovraespressi nei microsporociti rispetto alle microspore (p-value<0,05 e RQ>1,5) (Cont.)

Probe Set ID	Descrizione del gene	RQ
Les.101.1.S1_at	gtp cyclohydrolase ii	5,29
Les.109.1.S1_at	beta-galactosidase stbg6	27,83
Les.1121.1.S1_at	glutamate binding protein	4,90
Les.1170.1.A1_at	---NA---	3,46
Les.1172.1.A1_at	zinc finger	3,54
Les.1190.1.A1_at	---NA---	7,28
Les.1203.1.A1_at	---NA---	8,34
Les.1252.1.S1_at	14-3-3 protein	3,33
Les.1289.1.A1_at	---NA---	6,66
Les.1346.1.A1_at	---NA---	6,40
Les.1493.1.S1_at	nitrilase 4b	4,92
Les.1500.1.A1_at	---NA---	3,54
Les.1703.1.S1_at	pfkb-type carbohydrate kinase family protein	1,63
Les.1719.1.A1_at	---NA---	2,13
Les.1822.1.S1_at	quiescin-sulfhydryl oxidase 2	2,66
Les.1906.1.S1_at	histone h2a protein	1,75
Les.1925.1.A1_at	dehydroascorbate reductase	6,53
Les.1929.1.A1_at	---NA---	2,71
Les.1977.1.S1_at	calcineurin B subunit-related	4,09
Les.20.1.S1_at	zeta-carotene desaturase	3,56
Les.2033.1.A1_a_at	---NA---	9,11
Les.2033.1.A1_at	---NA---	4,50
Les.2033.2.A1_at	---NA---	6,71
Les.2034.3.A1_at	---NA---	2,88
Les.205.1.S1_at	14-3-3 protein	2,93
Les.2101.1.A1_a_at	---NA---	2,79
Les.2200.1.S1_at	tubulin beta	7,09
Les.2203.1.S1_at	14-3-3 protein	13,72
Les.2334.1.A1_at	---NA---	2,65
Les.2335.1.A1_at	---NA---	5,40
Les.2567.1.S1_at	nramp transporter	4,62
Les.2605.1.A1_at	---NA---	3,08
Les.2662.1.A1_at	novel plant SNARE	1,74
Les.2708.2.S1_at	---NA---	5,74
Les.2813.2.A1_at	---NA---	20,67
Les.2831.1.S1_at	aldehyde dehydrogenase 1 precursor	8,36
Les.2842.2.A1_at	---NA---	6,39
Les.2868.1.S1_at	---NA---	4,21
Les.2876.1.A1_at	---NA---	5,74
Les.2911.1.S1_at	peptidylprolyl isomerase	2,30
Les.2929.1.S1_at	aldose 1-epimerase	5,59
Les.2944.1.A1_at	---NA---	11,81
Les.2944.1.A1_s_at	---NA---	6,15
Les.2949.1.S1_at	proliferating cell nuclear antigen	4,59
Les.2954.2.A1_at	---NA---	5,37
Les.2989.1.S1_at	histone h2a	4,54
Les.3090.1.S1_at	histone h3	12,58
Les.3104.1.S1_at	---NA---	4,25
Les.3104.2.S1_at	histone h2a	6,64
Les.3114.3.A1_at	---NA---	1,86
Les.3133.1.S1_at	calmodulin 1	2,62
Les.3154.1.A1_at	ribosomal protein l21	1,85

**Tabella 15: Cont.**

Probe Set ID	Descrizione del gene	RQ
Les.3208.1.S1_at	utp:uridylyltransferase	3,98
Les.3260.3.A1_at	---NA---	2,29
Les.3300.1.S1_at	annexin p34	4,09
Les.3304.1.A1_at	---NA---	1,73
Les.3318.1.A1_at	---NA---	3,78
Les.3318.3.S1_at	serine hydroxymethyltransferase 6	7,05
Les.3348.1.S1_at	embryo-specific protein 3	3,52
Les.3350.1.S1_at	granule-bound starch synthase	12,20
Les.3418.1.S1_at	alcohol dehydrogenase	5,35
Les.3468.1.S1_at	atp binding	7,78
Les.3559.1.A1_at	defensin protein	5,27
Les.3581.1.S1_at	class ii small heat shock protein le-	5,06
Les.3651.1.S1_at	s-adenosylmethionine synthase 3	2,43
Les.3678.1.S1_at	14-3-3 protein	4,94
Les.368.1.S1_at	gh3 family protein	32,49
Les.4013.1.S1_at	actin 2	2,51
Les.4098.1.S1_at	High mobility group	4,08
Les.411.2.A1_at	---NA---	5,99
Les.422.1.S1_at	nitrogen fixation protein	8,38
Les.425.1.S1_at	---NA---	23,94
Les.4281.1.A1_at	---NA---	4,47
Les.4330.1.S1_s_at	histone h1	5,85
Les.4331.1.S1_at	histone h4	1,68
Les.4336.2.A1_at	---NA---	2,18
Les.4342.1.S1_at	tubulin alpha	3,79
Les.4442.1.S1_s_at	histone h2b	6,20
Les.4462.1.S1_at	---NA---	2,66
Les.450.1.S1_at	kip-related cyclin-dependent kinase inhibitor 3	18,93
Les.4595.1.S1_at	atp-citrate lyase a-3	4,25
Les.4602.1.S1_at	ras-related grp-binding protein	6,50
Les.4622.1.S1_at	serine threonine-protein	2,53
Les.4623.1.S1_at	conserved hypothetical protein	11,48
Les.468.3.A1_at	---NA---	12,21
Les.4695.1.S1_at	caffeoyl- 3-o-methyltransferase	12,41
Les.4705.1.S1_at	phosphosulfolactate synthase-related protein	10,35
Les.4737.1.S1_at	early-responsive to dehydration erd	11,61
Les.4738.1.S1_at	nucleobase ascorbate transporter	8,37
Les.4747.1.S1_at	nadh dehydrogenase subunit i	4,32
Les.4757.1.S1_at	plastid hexose transporter	6,51
Les.4773.1.S1_at	hypothetical protein	3,18
Les.4815.1.S1_at	conserved hypothetical protein	6,65
Les.4831.1.S1_at	WD40-like [Medicago truncatula]	4,29
Les.4845.1.S1_at	---NA---	3,53
Les.496.1.A1_at	heat shock protein 70 -interacting	10,55
Les.499.1.A1_at	---NA---	10,75
Les.5105.1.S1_at	3'-5' exonuclease domain-containing protein	11,81
Les.5128.1.S1_at	senescence-related protein	12,34
Les.5141.1.S1_at	---NA---	6,36
Les.5165.1.S1_at	protein suppressor of gene silencing 3	6,70
Les.5222.1.S1_at	squalene epoxidase	3,47
Les.53.1.S1_at	shikimate kinase	3,05
Les.5307.1.S1_at	---NA---	2,47

**Tabella 15: Cont.**

Probe Set ID	Descrizione del gene	RQ
Les.5330.1.S1_at	---NA---	2,99
Les.5407.1.S1_at	ire homolog 1	11,04
Les.5446.1.S1_at	flap endonuclease-1b	8,15
Les.5473.1.S1_at	zinc finger family protein	4,33
Les.5539.1.S1_at	unnamed protein product	28,38
Les.5622.1.S1_at	pyridoxin biosynthesis protein	16,74
Les.5657.1.S1_at	RRA2 (Reduced Residual Arabinose 2)	6,12
Les.5680.1.S1_at	atp binding protein	12,67
Les.5687.1.S1_at	geranyl geranyl pyrophosphate	8,16
Les.5707.1.S1_at	protein phosphatase	2,80
Les.5712.1.S1_at	zinc finger family protein	11,86
Les.5740.1.S1_at	replication protein a 30 kda	6,24
Les.5761.1.S1_at	unnamed protein product	5,31
Les.5813.1.S1_at	rhm1 rol1	12,77
Les.5823.1.S1_at	cyclophilin	1,55
Les.5840.1.S1_at	beta tubulin	9,84
Les.5882.1.A1_at	---NA---	5,12
Les.5955.1.S1_at	CENP-C	3,90
Les.597.1.A1_at	---NA---	3,05
Les.642.1.S1_at	neutral invertase	18,75
Les.657.1.A1_at	---NA---	1,99
Les.657.2.A1_a_at	---NA---	1,64
Les.657.2.A1_at	---NA---	2,41
Les.665.1.A1_at	---NA---	1,75
Les.709.1.A1_at	---NA---	55,84
Les.734.1.S1_at	---NA---	2,17
Les.749.1.S1_at	---NA---	5,41
Les.782.1.S1_at	unnamed protein product	2,87
Les.812.3.A1_at	---NA---	5,42
Les.839.1.S1_at	small rubber particle	1,88
Les.889.2.S1_a_at	af124139_1-like protein	2,38
Les.901.1.A1_at	---NA---	2,91
Les.907.1.A1_at	---NA---	6,00
Les.910.1.S1_at	casein kinase 2 catalytic subunit	3,51
Les.915.1.S1_at	hypothetical protein	5,63
Les.963.3.A1_at	---NA---	3,90
LesAffx.16983.1.S1_at	phosphate translocator-related	11,01
LesAffx.17081.1.S1_at	protein binding	1,71
LesAffx.18594.1.S1_at	ser thr protein kinase	3,20
LesAffx.19015.1.S1_at	signal peptidase subunit	3,19
LesAffx.2226.2.A1_at	ribonucleotide reductase small subunit	3,58
LesAffx.23154.1.S1_at	signal peptidase complex subunit 3	4,11
LesAffx.23154.2.S1_at	signal peptidase subunit family protein	5,38
LesAffx.29242.1.S1_at	aldo keto reductase family protein	40,46
LesAffx.52595.1.S1_at	endoplasmic reticulum oxidoreductin	5,19
LesAffx.59277.2.S1_at	nucleotide sugar epimerase	19,72
LesAffx.59777.1.S1_at	membrane protein	1,61
LesAffx.60488.1.S1_at	gcn5-related n-acetyltransferase	2,30
LesAffx.60610.1.S1_at	ubiquitin-conjugating enzyme e2 c	9,85
LesAffx.60610.2.S1_at	ubiquitin-conjugating enzyme e2	7,51
LesAffx.71464.2.S1_at	---NA---	5,15
LesAffx.71495.1.S1_at	NTGP5 [Nicotiana tabacum]	7,93

## 7.6 Analisi Real Time-PCR quantitativa

Per confermare i dati di espressione genica ottenuti dai microarray, sono stati selezionati 5 geni (~5%) tra quelli specifici dei microsporociti (Tab 14). La validazione dei dati è stata condotta mediante Real Time-qPCR con il cDNA retrotrascritto dal cRNA utilizzato per l'ibridazione dei "GeneChip Tomato Genome Affymetrix".

L'analisi di espressione ha confermato i risultati dei microarray mostrando che i valori di espressione ottenuti con le due metodologie sono concordi (tab 16).

**Tabella 16:** Geni analizzati mediante Real Time. Per ciascuno di essi si riporta il livello di espressione nei microsporociti rispetto alle microspore ottenuto negli esperimenti di Real Time (Relative Quantification, RQ qRT-PCR) e microarray (RQ Microarray)

Probe Set ID	Descrizione del gene	RQ qRT-PCR	RQ Microarray
Les.1925.2.S1_at	dehydroascorbate reductase	+ 9,69	+ 5,86
LesAffx.51318.1.S1_at	nodulin MtN3 family protein	+ 47,23	+ 49,59
LesAffx.55779.1.S1_at	clathrin binding protein-like	+ 11,81	+ 6,58
Les.3563.1.S1_at	auxin-binding protein 1	+ 2,62	+ 4,55
Les.468.2.S1_at	histone deacetylase	+ 52,71	+ 23,73

## 8. CONCLUSIONI

Il lavoro svolto nella presente tesi ha avuto lo scopo di approfondire le conoscenze relative al processo meiotico in una specie modello, *Arabidopsis thaliana*, e in una specie di interesse agrario, il pomodoro (*Solanum lycopersicum*).

In *Arabidopsis* sono stati perseguiti due obiettivi in accordo con il progetto europeo “Systematic Analysis of Factors Controlling Meiotic Recombination in Higher Plants (MeioSys)” nell’ambito del quale è stato effettuato, in parte, questo lavoro di tesi:

- comprendere il ruolo dell’acetilazione istonica in meiosi;
- determinare lo stato dell’acetilazione e della metilazione istoniche nelle fasi della meiosi.

Nell’ambito del primo obiettivo, l’analisi sistematica dei geni codificanti per acetilasi/deacetilasi istoniche (HAT/HDAC) tramite una strategia di ‘reverse genetics’ ha consentito l’identificazione di una linea (CS 31355) che ha un’inserzione nel gene *HDA19* e presenta riduzione nella fertilità della siliqua e del polline. La presenza di anomalie nei processi meiotici dell’appaiamento, formazione dei crossing-over e segregazione indica un ruolo meiotico per la deacetilasi istonica *HDA19*. Indagini bioinformatiche hanno indicato che altri geni codificanti HDAC, *HDA6*, *HDA7* ed *HDA9*, erano candidati ad avere un ruolo in meiosi. Le linee inserzionali per *HDA7* e *HDA9* ed RNAi per *HDA6* non hanno consentito di accertare se queste deacetilasi hanno un ruolo in meiosi. L’analisi sistematica dei geni basata sull’impiego delle linee SALK è risultata non sempre efficace per diversi motivi: in alcuni casi si sono verificate assenza dell’inserzione, presenza di inserzioni in più geni, stato genetico dell’inserzione non conforme al dichiarato.

Il secondo obiettivo è stato quello di stabilire lo stato dell’acetilazione istonica e, parzialmente, della metilazione durante la microsporogenesi, non essendo mai stato descritto in pianta.

I risultati dell’immunolocalizzazione hanno mostrato che gli istoni H3 ed H4 sono acetilati nelle diverse fasi meiotiche. Il residuo K4 dell’istone H3 risulta trimetilato in tutte le fasi della meiosi e non è presente sull’eterocromatina. I risultati ottenuti, confrontati con quelli della meiosi di mammifero, hanno mostrato che i pattern delle modifiche istoniche nella meiosi in pianta sono differenti. Questo potrebbe indicare una diversità nella regolazione della cromatina nelle cellule germinali. Comunque, la relativa stabilità delle modifiche istoniche durante la meiosi, considerata nella presente tesi a livello globale, non esclude che possano esserci variazioni a livello locale.

In *Solanum lycopersicum* l’obiettivo del lavoro di tesi, svolto nell’ambito del progetto MIUR Genopom, è stato la messa a punto di una strategia di Laser Microdissection Microarray (LMM) per identificare geni espressi in meiosi, con particolare interesse per quelli responsabili dell’acetilazione/deacetilazione istonica in pomodoro. Il confronto è stato effettuato tra le cellule madri del polline (microsporociti) nello stadio pre-meiotico/meiotico e le microspore nello stadio uni- e bi-nucleato. Questo approccio, che combina la tecnologia Laser Capture Microdissection (LCM) e l’analisi microarray, ha consentito l’isolamento di 268 geni, di cui 112 specifici e 156 up-regolati durante la meiosi di pomodoro. L’annotazione di questi geni, sebbene parziale e rappresentativa di una parte del genoma, ha indicato la presenza, tra i geni meiosi-specifici, di due geni noti per essere espressi in meiosi, *meiotic serine proteinasi* e *rad51*. Questo risultato, insieme all’assenza di geni specifici del tappeto, la cui presenza avrebbe indicato prelievo di cellule diverse dai meiociti, evidenzia la specificità del tipo di cellule isolate con LCM. L’annotazione, infine, ha consentito di individuare due deacetilasi istoniche espresse in maniera specifica nei meiociti e dunque con un putativo ruolo in meiosi.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Agalioti T, Chen G and Thanos D (2002). Deciphering the transcriptional histone acetylation code for a human gene. *Cell* 111, 381-392.

Agashe B, Prada CK and Siddiqi I (2002). Identification and analysis of *DYAD*: a gene required for meiotic chromosome organization and female meiotic progression in *Arabidopsis*. *Development* 12, 3935-3943.

Aggarwal BD and Calvi BR (2004). Chromatin regulates origin activity in *Drosophila* follicle cells. *Nature* 430, 372-376.

Ahn SH, Cheung WL, Hsu JY, Diaz RL, Smith MM and Allis CD. (2005). Sterile 20 kinase phosphorylates histone H2B at serine 10 during hydrogen peroxide-induced apoptosis in *S. cerevisiae*. *Cell* 120, 25-36.

Akiyama T, Nagata M and Aoki F (2006). Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9, 7339-7344.

Akutsu N, Iijima K, Hinata T and Tauchi H (2007). Characterization of the plant homolog of Nijmegen breakage syndrome 1: Involvement in DNA repair and recombination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**(2), 394-398.

Alvarez-Venegas R and Avramova Z (2005). Methylation Patterns of Histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive *Arabidopsis* genes and in *atx1* mutants. *Nucl. Acids Res.* 33, 5199-5207.

Alvarez-Venegas R, Pien S, Sadler M, Witmer X, Grossniklaus U and Avramova Z (2003). ATX-1, an *Arabidopsis* homolog of Trithorax, activates flower homeotic genes. *Curr. Biol.* 13, 627-637.

Alvarez-Venegas R, Sadler M, Hlavacka A, Baluska F, Xia Y, Lu G, Firsov A, Sarath G, Moriyama H, Dubrovsky J and Avramova Z (2006a). The *Arabidopsis* Homolog of Trithorax, ATX1, Binds Phosphoinositide 5-Phosphate and the Two Regulate a Common Set of Target Genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 6049-6054.

Armstrong SJ and Jones GH (2001). Female meiosis in wild-type *Arabidopsis thaliana* and in two meiotic mutants. *Sex. Plant Reprod.* 13, 177-183.

Armstrong SJ and Jones GH (2003). Meiotic cytology and chromosome behaviour in wild-type *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 54, 1-10.

Armstrong SJ, Caryl AP, Jones GH, and Franklin FCH (2002). ASY1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *J. Cell Sci.* 115, 3645-3655.

Aufsatz W, Mette MF, Van Der Winden J, Matzke M, Matzke AJ (2002). HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J.* 21, 6832-6841.

Avramova Z (2009). Evolution and pleiotropy of TRITHORAX function in *Arabidopsis*. Int. J. Dev. Biol. 53, 371–81.

Balasubramanian R, Pray-Grant MG, Selleck W, Grant PA and Tan S (2002). Role of the Ada2 and Ada3 transcriptional coactivators in histone acetylation. J. Biol. Chem. 277(10), 7889-7995.

Bannister AJ and Kouzarides T (2004). Histone methylation: recognizing the methyl mark. Methods Enzymol. 376, 269–288.

Barra L (2008). Tesi di Dottorato in Scienze Biotechnologiche XXI ciclo – Università degli studi di Napoli Federico II.

Bass HW, Bordoli SJ and Foss EM (2003). The desynaptic (dy) and desynaptic1 (dys1) mutations in maize (*Zea mays* L.) cause distinct telomere-misplacement phenotypes during meiotic prophase. J. Exp. Bot. 54, 39-46.

Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA and Dean C (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature 427, 164–67.

Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, Khanna A, Marshall M, Moxon S, Sonnhammer EL, Studholme DJ, Yeats C and Eddy SR (2004). The Pfam protein families database. Nucleic Acids Res. 32, D138–D141.

Baumbusch LO, Thorstensen T, Krauss V, Fischer A, Naumann K *et al.* (2001). The *Arabidopsis thaliana* genome contains at least 29 active genes encoding SET domain proteins that can be assigned to four evolutionarily conserved classes. Nucleic Acids Res. 29, 4319–33.

Bean CJ, Schaner CE and Kelly WG (2004). Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. Nat. Genet. 36, 100-105.

Behmamed M, Bertrand C, Servet C and Zhou DX (2006). *Arabidopsis* GCN5, HD1, and TAF1/HAF2 interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. Plant Cell 18, 2893-2903.

Berger SL (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. Nature 447, 407-412.

Bergink S, Salomons FA, Hoogstraten D, Groothuis TA, de Waard H, Wu J, Yuan L, Citterio E, Houtsmuller AB, Neefjes J *et al.* (2006). DNA damage triggers nucleotide excision repairdependent monoubiquitylation of histone H2A. Genes Dev. 20, 1343–1352.

Bernstein BE, Humphrey EL, Erlich RL, Schneider R, Bouman P, Liu JS, Kouzarides T and Schreiber SL (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. Proc. Natl. Acad.Sci. USA 99, 8695-8700.

Bertrand C, Benhamed M, Li YF, Ayadi M, Lemonnier G, Renou JP, Delarue M and Zhou DX (2005). *Arabidopsis* HAF2 gene encoding TATA-binding protein (TBP)-associated factor TAF1, is required to integrate light signal to regulate gene expression and growth. J. Biol. Chem. 280,1465-1473.



Bertrand C, Bergounioux C, Domenichini S, Delarue M and Zhou DX (2003). *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS Pathway. J. Biol. Chem, 278, 28246–28251.

Bhat RA, Borst JW, Riehl M and Thompson RD (2004). Interaction of maize Opaque-2 and the transcriptional co-activators GCN5 and ADA2, in the modulation of transcriptional activity. Plant Mol. Biol. 55(2), 239-52.

Bhat RA, Riehl M, Santandrea G, Velasco R, Slocombe S, Donn G, Steinbiss HH, Thompson RD and Becker HA (2003). Alteration of GCN5 levels in maize reveals dynamic responses to manipulating histone acetylation. Plant J. 33(3), 455-69.

Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, Jung JW and Lambert GM (2003). A gene expression map of the *Arabidopsis* root. Science 302, 1956-1960.

Bishop DK and Zickler D (2004). Early decision; meiotic crossover interference prior to stable strand exchange and synapsis. Cell 117, 9-15.

Bishop DK, Park D, Xu L and Kleckner N (1992). DMC1: A meiosis-specific yeast homolog of Escherichia coli recA required for recombination, synaptonemal complex formation and cell cycle progression. Cell 69, 439-456.

Bleuyard JY and White CI (2004b). The *Arabidopsis* homologue of Xrcc3 plays an essential role in meiosis. EMBO J. 23, 439-449.

Boateng KA, Yang X, Dong F, Owen HA and Makaroff CA (2008). SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. Mol. Plant. 1, 620– 633.

Borde V, ASH Goldman and Lichten M (2000). Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. Science 290, 806-809.

Borde V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V and Nicolas A (2009). Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. EMBO J. 28, 99–111.

Borde V, Wu TC and Lichten M (1999). Use of a recombination reporter insert to define meiotic recombination domains on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell Biol. 19(7), 4832-42.

Botuyan MV, Lee J, Ward IM, Jim J-E, Thompson JR, Chen J and Mer G (2006). Structural basis for the methylation statespecific recognition of histone H4-K20 by 53BP1 and Crb2 in DNA repair. Cell 127, 1361–1373.

Brandt S, Kloska S, Altman T and Kehr J (2002). Using array hybridization to monitor gene expression at the single cell level. J. Exp. Bot. 53, 2315-2323.

Briggs SD, Bryk M, Strahl BD, Cheung WL, Davie JK, Dent SY, Winston F and Allis CD (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev. 15, 3286–3295.

Brown MA, Sims III RJ, Gottlieb PD and Tucker PW (2006). Identification and characterization of Smyd2: a split SET/MYND domain-containing histone H3 lysine 36-

specific methyltransferase that interacts with the Sin3 histone deacetylase complex. *Mol. Cancer* 5, 26–36.

Brown RC and Lemmon BE (2001). The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* 215(1-4), 35-49.

Bryk M, Briggs SD, Strahl BD, Curcio MJ, Allis CD and Winston F (2002). Evidence that Set1, a factor required for methylation of histone H3, regulates rDNA silencing in *S. cerevisiae* by a Sir2-independent mechanism. *Curr. Biol.* 12, 165-170.

Buard J, Barthes P, Grey C and de Massy B (2009). Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J.* 28, 2616–2624.

Bui HT, Van Thuan N, Kishigami S, Wakayama S, Hikichi T, Ohta H, Mizutani E, Yamaoka E, Wakayama T and Miyano T (2007). Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction*, 133, 371–382.

Buonomo SB, Clyne RK, Fuchs J, Loidl J, Uhlmann F and Nasmyth K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic coesin Rec8 by separin. *Cell* 103, 387-398.

Burgemeister R (2005) New aspects of laser microdissection in research and routine. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 409-412.

Burgess SM, Ajimura M and Kleckner N (1999). GCN5-dependent histone H3 acetylation and RPD3-dependent histone H4 deacetylation have distinct, opposing effects on IME2 transcription, during meiosis and during vegetative growth, in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 6835–6840.

Byzova MV, Franken J, Aarts MG, de Almeida-Engler J, Engler G, Mariani C, Van Lookeren Campagne MM, Angenent GC (1999). *Arabidopsis* *STERILE APETALA*, a multifunctional gene regulating inflorescence, flower, and ovule development. *Gene Dev.* 13, 1002-1014.

Cai X and Makaroff CA (2001). The *dsy10* mutation of *Arabidopsis* results in desynapsis and a general breakdown in meiosis. *Sex. Plant Reprod.* 14, 63-67.

Cai X, Dong F, Edelmann RE and Makaroff CA (2003). The *Arabidopsis* SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *J. Cell Sci.* 116, 2999-3007.

Calonje M, Sanchez R, Chen L and Sung ZR (2008). EMBRYONIC FLOWER1 participates in polycomb group-mediated AG gene silencing in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 277–91.

Carrozza MJ, Li B, Florens L, Suganuma T, Swanson SK, Lee KK, Shia WJ, Anderson S, Yates J, Washburn MP and Workman JL (2005). Histone H3 methylation by Set2 directs deacetylation of coding regions by Rpd3S to suppress spurious intragenic transcription. *Cell* 123, 581–592.

Cartagena JA, Matsunaga S, Seki M, Kurihara D, Yokoyama M *et al.* (2008). The *Arabidopsis* SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. *Dev. Biol.* 315, 355–68.

Caryl AP, Armstrong SJ, Jones GH and Franklin FCH (2000). A homologue of the yeast *HOP1* gene is inactivated in the *Arabidopsis* meiotic mutant *asy1*. *Chromosoma* 109, 62–71.

Castle LA, Errampalli D, Atherton TL, Franzmann LH, Yoon ES and Meinke DW (1993). Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Mol. Gen. Genet.* 241(5-6), 504-14.

Celic I, Masumoto H, Griffith WP, Meluh P, Cotter RJ, Boeke JD and Verreault A (2006). The sirtuins hst3 and Hst4p preserve genome integrity by controlling histone h3 lysine 56 deacetylation. *Curr. Biol.* 16, 1280–1289.

Chanvivattana Y, Bishop A, Schubert D, Stock C, Moon YH, Sung ZR and Goodrich J (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development* 131, 5263-5276.

Chaudhury AM (1993). Nuclear genes controlling male fertility. *Plant Cell* 5, 1277-1283.

Chaudhury AM, Ming L, Miller C, Craig S, Dennis ES, Peacock WJ. (1997). Fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4223–28.

Chelysheva L, Diallo S, Vezon D, Gendrot G, Vrielynck N, Belcram, Rocques N, Marquez-Lema A, Bhatt AM, Horlow C, Mercier R and Grelon M (2005). AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *J. Cell Sci.* 118, 4621-4632

Chelysheva L, Gendrot G, Vezon D, Doutriaux MP, Mercier R and Grelon M (2007). Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 3, e83.

Chen C, Marcus AI, Li WX, Hu Y, Calzada JP, Grossniklaus U, Cyr RJ and Ma H (2002). The *Arabidopsis* *ATK1* gene is required for spinlde morphogenesis in male meiosis. *Development* 129, 2401-2409.

Chen C, Zhang W, Timofejeva L, Gerardin Y, and Ma H (2005). The *Arabidopsis* ROCK-N-ROLLERS gene encodes a homolog of the yeast ATP-dependent DNA helicase MER3 and is required for normal meiotic crossover formation. *Plant J.* 43, 321-334.

Chen L, Cheng J-C, Castle L and Sung ZR (1997). *EMF* genes regulate *Arabidopsis* inflorescence development. *Plant Cell* 9, 2011– 2024.

Chen T, Sun H, Lu J, Zhao Y, Tao D, LI XO and Huang B (2002). The acetylation of in *Drosophilla melanogaster*. *Archives Biochem. Bioph.* 408, 171-176.

Cheung VG, Sherman SL and Feingold E (2010). Genetic control of hotspots. *Science* 327(5967), 791-2.

Chevillard-Briet M, Trouche D, Vandell L. (2002). Control of CBP coactivating activity by arginine methylation. *EMBO J.* 21, 5457–66.

Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L and Degrossi F (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol. Biol. Cell* 14, 3821–3833.

Clements A, Poux AN, Lo WS, Pillus L, Berger SL and Marmorstein R (2003). Structural basis for histone and phosphohistone binding by the GCN5 histone acetyltransferase. *Mol. Cell* 12, 461–473.

Consiglio F, Carputo D, Frusciante L, Monti LM and Conicella C (2007). Meiotic mutations and crop improvement. *Plant Breeding Rev.* 6, 163-214.

Copenhaver GP, Housworth EA and Stahl FW (2002). Crossover interference in *Arabidopsis*. *Genetics* 160, 1631-1639.

Cornea A and Mungenast A (2002). Comparison of current equipment. *Methods Enzymol.* 356, 3-12.

Couteau F, Belzile F, Horlow C, Grandjean O, Vezon D and Doutriaux MP (1999). Random chromosome segregation without meiotic arrest in both male and female meiocytes of a *dmc1* mutant of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 11,1623-1634.

Cox MM (1999). Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63, 311-366.

Crane YM and Gelvin SB (2007). RNA-mediated gene silencing reveals involvement of *Arabidopsis* chromatin-related genes in *Agrobacterium*-mediated root transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 15156-15161.

Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ and Kouzarides T. (2004). Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* 118, 545–553.

Dai J, Sultan S, Taylor SS and Higgins JM (2005). The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* 19, 472–488.

Dangl M, Brosch G, Haas H, Loidl P and Lusser A (2001). Comparative analysis of HD2 type histone deacetylase in higher plants. *Planta* 213, 280-285.

Datson NA, Van der Perk-de Jong J, Van den Berg MP, de Kloet ER, and Vreugdenhil E (1999). MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue. *Nucleic Acids Res.* 27, 1300-1307.

Davies JN and Hobson GE (1981). The constituents of tomato fruit-the influence of environment, nutrition, and genotype. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 15(3), 205-280.

Dawe RK (1998). Meiotic chromosome organization and segregation in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 371-395.

De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM and Eppig JJ (2004). Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* 275, 447– 458.

de los Santos T, Hunter N, Lee C, Larkin B, Loidl J and Hollingsworth NM (2003). The Mus81/Mms4 endonuclease acts independently of double-Holliday junction resolution to promote a distinct subset of crossovers during meiosis in budding yeast. *Genetics* 164, 81-94.

De Lucia F, Crevillen P, Jones AM, Greb T and Dean C (2008). A PHD-polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 16831–36.

Demura T, Tashiro G, Horiguchi G, Kishimoto N, Kubo M, Matsuoka N, Minami A, Nagata M, Nakamura K and Okamura Y (2002). Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression program during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *PNAS* 99, 15794-15799.

Deng W, Liu C, Pei Y, Deng X, Niu L and Cao X (2007). Involvement of the histone acetyltransferase AtHAC1 in the regulation of flowering time via repression of FLOWERING LOCUS C in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143(4), 1660-8.

d'Erfurth I, Jolivet S, Froger N, Catrice O, Novatchkova M, Simon M, Jenczewski E and Mercier R (2008). Mutations in AtPS1 (*Arabidopsis thaliana* parallel spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains. *PLoS Genet.* 4(11), e1000274.

Dernburg AF, McDonald K, Moulder G, Barstead R, Dresser M and Villeneuve AM (1998). Meiotic recombination in *C. elegans* initiates by a conserved mechanism and is dispensable for homologous chromosome synapsis. *Cell* 94, 387-398.

Dong G, Ma DP and Li J (2008). The histone methyltransferase SDG8 regulates shoot branching in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 659–64.

Drews GN, Lee D and Christensen CA (1998). Genetic analysis of female gametophyte development and function. *Plant Cell.* 10(1), 5-17.

Du LL, Nakamura TM and Russell P (2006). Histone modification dependent and independent pathways for recruitment of checkpoint protein Crb2 to double-strand breaks. *Genes Dev.* 20, 1583–1596.

Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M *et al.* (2006). Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes & Dev.* 20, 1283-1293.

Earley KW, Shook MS, Brower-Toland B, Hicks L and Pikaard CS (2007). In vitro specificities of *Arabidopsis* co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation *The Plant J.* 52, 615–626.

Ebbs ML and Bender J (2006). Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* 18, 1166–76.

Ebbs ML, Bartee L and Bender J (2005). H3 lysine 9 methylation is maintained on a transcribed inverted repeat by combined action of SUVH6 and SUVH4 methyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10507–15.

Ehrig T, Abdulkadir SA, Dintzis SM, Milbrandt J and Watson MA (2001). Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. *J. Mol. Diagn.* 3, 22–25.

Ekwall K, Olsson T, Turner BM, Cranston G and Allshire RC (1997). Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell* 91, 1021–1032.

Emmanuel E and Levy AA (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 112–117.

Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, Weiss RA, Liotta LA (1996). Laser Capture Microdissection. *Science* 274, 998–1001.

Emre NC, Ingvarsdottir K, Wyce A, Wood A, Krogan NJ, Henry KW, Li K, Marmorstein R, Greenblatt JF, Shilatifard A and Berger SL (2005). Maintenance of low histone ubiquitylation by Ubp10 correlates with telomere-proximal Sir2 association and gene silencing. *Mol. Cell* 17, 585–594.

Endo T, Naito K, Aoki F, Kume S and Tojo H (2005). Changes in histone modifications during in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 123128.

Eot-Houllier G, Fulcrand G, Watanabe Y, Magnaghi-Jaulin L and Jaulin C (2008). Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 22, 2693–2744.

Fan QQ and Petes TD (1996). Relationship between nuclease-hypersensitive sites and meiotic recombination hot spot activity at the *HIS4* locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16(5), 2037–43.

Fan QQ, Xu F and Petes TD (1995). Meiosis-specific double-strand DNA breaks at the *HIS4* recombination hot spot in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: control in *cis* and *trans*. *Mol. Cell Biol.* 15, 1679–1688.

Fillingham J, Keogh MC and Krogan NJ (2006). gH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem. Cell Biol.* 84, 568–577.

Finnegan EJ and Dennis ES (2007). Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr. Biol.* 17, 1978–83.

Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H and Allis CD (2005). Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* 438, 1116–1122.

Frye RA (1999). Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 260, 273–279.

Fuchs J, Demidov D, Houben A and Schubert I (2006) Chromosomal histone modification patterns from conservation to diversity. *Trends Plant Sci.* 11, 199–208.

Gallego ME, Jeanneau M, Granier F, Bouchez D, Bechtold N and White CI (2001). Disruption of the *Arabidopsis* RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant J.* 25, 31-41.

Garcia BA, Hake SB, Diaz RL, Kauer M, Morris SA, Recht J, Shabanowitz J, Mishra N, Strahl BD, Allis CD and Hunt DF (2007) Organismal differences in post-translational modifications in histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.* 282, 7641–7655.

Gardner RG, Nelson ZW and Gottschling DE (2005). Ubp10/Dot4p regulates the persistence of ubiquitinated histone H2B: distinct roles in telomeric silencing and general chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 25, 6123–6139.

Gaudin V, Libault M, Pouteau S, Juul T, Zhao G *et al.* (2001). Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*. *Development* 128: 4847– 58.

Gendall A R, Levy Y Y, Wilson A and Dean C (2001). The *VERNALIZATION 2* gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in *Arabidopsis*. *Cell* 107, 525–535.

Gerton JL, DeRisi J, Shroff R, Lichten M, Brown PO and Petes TD (2000). Global mapping of meiotic recombination hotspots and coldspots in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS* 97(21), 11383-11390.

Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA and Greenhut SF (2002). Evaluation of non-formalin tissue fixation for molecular profiling studies. *Am. J. Pathol.* 160, 449-457.

Goodrich J, Puangsomlee P, Martin M, Long D, Meyerowitz EM and Coupland G (1997). A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in *Arabidopsis*. *Nature* 386, 44–51.

Gordon M, Holt DG, Panigrahi A, Wilhelm BT, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bahler J and Cairns BR (2007). Genome-wide dynamics of SAPHIRE, an essential complex for gene activation and chromatin boundaries. *Mol. Cell. Biol.* 27, 4058-4069.

Gottlieb S and Esposito RE (1989). A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell* 56, 771-776.

Gozani O, Karuman P, Jones DR, Ivanov D, Cha J, Lugovskoy AA, Baird CL, Zhu H, Field SJ, Lessnick SL, Villasenor J, Mehrotra B, Chen J, Rao VR, Brugge JS *et al.* (2003). The PHD finger of the chromatin-associated protein ING2 functions as a nuclear phosphoinositide receptor. *Cell* 114, 99-111.

Grant PA, Eberharter A, John S, Cook RJ, Turner BM and Workman JL (1999). Expressed lysine acetylation specificity of Gcn5 in native complexes. *J. Biol. Chem.* 274(9), 5895-5900.

Grelon M, Vezon D, Gendrot G and Pelletier G (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *EMBO J.* 20, 589-600.

- Grossniklaus U, Vielle-Calzada JP, Hoepfner MA, Gagliano WB (1998). Maternal control of embryogenesis by *Medea*, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280, 446-450.
- Grozier CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D, Schreiber SL (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *J. Biol. Chem.* 276, 38837-38843.
- Gu L, Wang Q and Sun Q-Y (2010). Histone modifications during mammalian oocyte maturation: Dynamics, regulation and functions. *Cell Cycle* 9(10), 1-9.
- Guo L, Yin B, Zhou J, Li X and Deng XW (2006). Development of rabbit monoclonal and polyclonal antibodies for detection of site-specific histone modifications and their application in analyzing overall modification levels. *Cell Res.* 16, 519-27.
- Gyory I, Wu J, Fejer G, Seto E and Wright KL (2004). PRDI-BF1 recruits the histone H3 methyltransferase G9a in transcriptional silencing. *Nat. Immunol.* 5, 299-308.
- Han SK, Song JD, Noh YS and Noh B (2007). Role of plant CBP/p300-like genes in the regulation of flowering time. *Plant J.* 49(1), 103-14.
- Hardke C and Berleth T (1998). The *Arabidopsis* MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO J.* 17, 1405-1411.
- Hartung F and Puchta H (2001). Molecular characterization of homologues of both subunits A (SPO11) and B of the archaeobacterial topoisomerase 6 in plants. *Gene* 271, 81- 86.
- Hartung F and Puchta H (2000). Molecular characterization of two paralogous SPO11 homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Nuc. Acids Res.* 28, 1548-1554.
- Hartung F and Puchta H (1999). Isolation of the complete cDNA of the Mre11 homologue of *Arabidopsis* (accession No. AJ243822) indicates conservation of DNA recombination mechanisms between plants and other eukaryotes. *Plant Physiol.* 121, 312.
- Hassold T, Hall H and Hunt P (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum. Mol. Genet.* 16(2), R203-8.
- Havekes FWJ, de Jong JH, Heyting C and Ramanna MS (1994). Synapsis and chiasma formation in four meiotic mutants of tomato (*Lycopersicon esculentum*) *Chromosome Res.* 2, 315-325.
- Hayashi K, Yoshida K and Matsui Y (2005). A histone H3 methyltransferase controls epigenetic events required for meiotic prophase. *Nature* 438, 374-378.
- He Y, Michaels SD and Amasino RM (2003). Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. *Science* 302, 1751-54.
- Hennig L, Taranto P, Walser M, Schonrock N and Grissem W (2003) *Arabidopsis* MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development* 130, 2555-2565.



Hernández-Hernández A, Ortiz R, Ubaldo E, Echeverría Martínez OM, Vázquez-Nin GH and Recillas-Targa F (2010). Synaptonemal complex stability depends on repressive histone marks of the lateral element-associated repeat sequences. *Chromosoma* 119, 41-58.

Higgins JD, Armstrong SJ, Franklin FCH and Jones GH (2004). The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18, 2557-2570.

Higgins JD, Ewen F, Buckling F, Franklin CH and Jones GH (2008). Expression and functional analysis of *AtMUS81* in *Arabidopsis* meiosis reveals a role in the second pathway of crossing-over. *Plant J.* 54, 152-162.

Higgins JD, Sanchez-Moran E, Armstrong SJ, Jones GH and Franklin FCH (2005). The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev.* 19, 2488-2500.

Hiragami K and Festenstein R (2005). Heterochromatin protein 1: A pervasive controlling influence. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 2711-2726.

Hirano T (2000). Chromosome cohesion, condensation and separation. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 115-144.

Hirano T (2002). The ABCs of SMC proteins: two-armed ATPases for chromosome condensation, cohesion, and repair. *Genes Dev.* 16, 399-414.

Hollender C and Liu Z (2008). Histone Deacetylase Gene in *Arabidopsis* Development. *J. Integr. Plant Biol.* 50 (7), 875-885.

Hollingsworth NM and Brill, SJ (2004). The Mus81 solution to resolution: generating meiotic crossovers without Holliday junctions. *Genes Dev.* 18, 117-125.

Hollingsworth NM, Ponte L and Halsey C (1995). MSH5, a novel MutS homolog, facilitates meiotic reciprocal recombination between homologs in *Saccharomyces cerevisiae* but not mismatch repair. *Genes Dev.* 9, 1728-1739.

Honys D and Twell D (2003). Comparative analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome. *Plant Physiol.* 132, 640-652.

Honys D and Twell D (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 5(11), R85.

Huang L, Sun Q, Qin F, Li C, Zhao Y and Zhou DX (2007). Down-regulation of a SILENT INFORMATION REGULATOR2-related histone deacetylase gene, OsSRT1, induces DNA fragmentation and cell death in rice. *Plant Physiol.* 144, 1508-1519.

Huang LE, Luzzi V, Ehrig T, Holtschlag V and Watson MA (2002). Optimized tissue processing and staining for laser capture microdissection and nucleic acid retrieval. *Methods Enzymol.* 356, 49-62.

Huang Y (2002). Transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic. Acids. Res.* 30(7), 1465-82.

Hulskamp M, Parekh NS, Grini P, Schneitz K, Zimmermann I, Lolle SJ and Pruitt RE (1997). The *STUD* gene is required for male-specific cytokinesis after telophase II of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Biol.* 187, 114-124.

Iizuka M, Matsui T, Takisawa H and Smith MM (2006). Regulation of replication licensing by acetyltransferase Hbo1. *Mol. Cell. Biol.* 26, 1098–1108.

Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M and Guarente L (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 in an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800.

Ishii S, Kurasawa Y, Wong J and Yu-Lee LY (2008). Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 105, 4179–4184.

Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L *et al.* (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNAmethylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma* 112, 308–15.

Jackson JP, Lindroth AM, Cao X and Jacobsen SE (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* 416, 556–60.

Jacob Y, Feng S, Leblanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H *et al.* (2009) ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 763–768

Jang IC, Pahk YM, Song SI, Kwon HJ, Nahm BH and Kim JK (2003). Structure and expression of the rice class-I type histone deacetylase genes OsHDAC1-3: OsHDAC1 overexpression in transgenic plants leads to increased growth rate and altered architecture. *Plant J.* 33(3), 531-41.

Jasencakova Z, Meister A, Walter J, Turner BM and Schubert I (2000). Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlate with replication rather than transcription. *Plant Cell* 12, 2087-2100.

Jeppesen P and Turner BM (1993). The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell* 74, 281-289.

Jiang D, Yang W, He Y and Amasino RM (2007). *Arabidopsis* relatives of the human lysine-specific Demethylase1 repress the expression of FWA and FLOWERING LOCUS C and thus promote the floral transition. *Plant Cell* 19, 2975–87.

Jiang H, Wang FF, Wu YT, Zhou X, Huang XY, Zhu J, Gao JF, Dong RB, Cao KM and Yang ZN (2009). MULTIPOLAR SPINDLE 1 (MPS1), a novel coiled-coil protein of *Arabidopsis thaliana*, is required for meiotic spindle organization. *Plant J.* 59(6), 1001-10.

Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R and Dean C (2000). Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. *Science* 290, 344–47.

Johnson LM, Bostick M, Zhang X, Kraft E, Henderson I *et al.* (2007). The SRA methylcytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Curr. Biol.* 17, 379–84.

Johnson LM, Law JA, Khattar A, Henderson IR and Jacobsen SE (2008). SRA-domain proteins required for DRM2-mediated de novo DNA methylation. *PLoS Genet.* 4, e1000280.

Joshi AA and Struhl K (2005). Eaf3 chromodomain interaction with methylated H3-K36 links histone deacetylation to Pol II elongation. *Mol. Cell* 20, 971–978.

Jullien PE, Katz A, Oliva M, Ohad N, Berger F. (2006). Polycomb group complexes self-regulate imprinting of the Polycomb group gene MEDEA in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 16, 486–92.

Kageyama S-I, Liu H, Kaneko N, Ooga M, Nagata M and Aoki F (2007). Alterations in epigenetic modifications during oocyte growth in mice. *Reproduction* 133, 85–94.

Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C and Jackson SP (2010). Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. *Science* 329(5997), 1348-53.

Karrer EE, Lincoln JE, Hogenhout S, Bennett AB, Bostock RM, Martineau B, Lucas WJ, Gilchrist DG and Alexander D (1995). In situ isolation of mRNA from individual plant cells: creation of cell-specific cDNA library. *PNAS* 92, 3814-3818.

Katis VL, Galova M, Rabitsch KP, Gregan J and Nasmyth K (2004). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Curr. Biol.* 14, 560–572.

Katz A, Oliva M, Mosquna A, Hakim O and Ohad N (2004). FIE and CURLY LEAF polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development. *Plant J.* 37(5), 707-19.

Keeney S (2001). Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Curr. Top. Dev. Biol.* 52, 1-53.

Kelly WG, Schaner CE, Dernburg AF, Lee MH, Kim SK, Villeneuve AM and Reinke V (2002). X-chromosome silencing in the germline of *C. elegans*. *Development* 129, 479-492.

Keogh MC, Kurdistani SK, Morris SA, Ahn SH, Podolny V, Collins SR, Schuldiner M, Chin K, Punna T, Thompson NJ *et al.* (2005). Cotranscriptional set2 methylation of histone H3 lysine 36 recruits a repressive Rpd3 complex. *Cell* 123, 593–605.

Kerk NM, Ceserani T, Tausta SL, Sussex IM and Nelson TM (2003). Laser capture microdissection of cells from plant tissues. *Plant Physiol* 132, 27-35.

Kim JM, Liu H, Tazaki M, Nagata M and Aoki F (2003). Changes in histone acetylation during mouse oocyte meiosis. *J. Cell Biol.* 162, 37–46.

Kinoshita T, Yadegari R, Harada JJ, Goldberg RB and Fischer RL (1999). Imprinting of the MEDEA polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm. *Plant Cell.* 11(10), 1945-52.

Kitajima TS, Miyazaki Y, Yamamoto M and Watanabe Y (2003). Rec8 cleavage by separase is required for meiotic nuclear divisions in fission yeast. *EMBO J* 22, 5643–5653.

Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA and Watanabe Y (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature*. 441(7089), 46-52.

Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K and Nasmyth K (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98, 91-103.

Klein S, Zenvirth D, Dror V, Barton AB, Kaback DB and Simchen G (1996). Patterns of meiotic double-strand breakage on native and artificial yeast chromosomes. *Chromosoma* 105(5), 276-84.

Klink VP, Overall CC, Alkharouf NW, MacDonald MH and Matthews BF (2007). Laser capture microdissection (LCM) and comparative microarray expression analysis of syncytial cells isolated from incompatible and compatible soybean (*Glycine max*) roots infected by the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Planta* 226, 1389-1409.

Klose RJ and Zhang Y (2007). Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 307–18.

Knapp S (2002) Tobacco to tomatoes: a phylogenetic perspective on fruit diversity in the Solanaceae. *J. Exp. Bot.* 53(377), 2001-2022.

Kolasinska-Zwierz P, Down T, Latorre I, Liu T, Liu XS and Ahringer J (2009). Differential chromatin marking of introns and expressed exons by H3K36me3. *Nat. Genet.* 41, 376–81.

Kouzarides T (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell* 128, 693–705.

Krishnamoorthy T, Chen X, Govin J, Cheung WL, Dorsey J, Schindler K, Winter E, Allis CD, Guacci V, Khochbin S *et al.* (2006). Phosphorylation of histone H4 Ser1 regulates sporulation in yeast and is conserved in fly and mouse spermatogenesis. *Genes Dev.* 20, 2580–2592.

Krysan PJ, Young JC, Tax F and Sussman MR (1996). Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 8145-8150.

Lachner M and Jenuwein T (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 286–298.

Lagacé M, Chantha SC, Major G, Matton DP (2003). Fertilization induces strong accumulation of a histone deacetylase (HD2) and of other chromatin-remodeling proteins in restricted areas of the ovules. *Plant Mol. Biol.* 53(6), 759-69.

Lam WS, Yang X and Makaroff CA (2005b). Characterization of *Arabidopsis thaliana* SMC1 and SMC3: evidence that AtSMC3 may function beyond chromosome cohesion. *J. Cell Sci.* 118, 3037-3048.

Lan F, Zaratiegui M, Villen J, Vaughn M W, Verdel A, Huarte M, Shi Y, Gygi SP, Moazed D and Martienssen RA (2007b). *S. pombe* LSD1 homologs regulate heterochromatin propagation and euchromatic gene transcription. *Mol. Cell* 26, 89-101.

Latrasse D, Benhamed M, Henry Y, Domenichini S, Kim W, Zhou D-X and Delarue M (2008). The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* 8(121) doi:10.1186/1471-2229-8-121.

Laux T, Mayer KF, Berger J and Jürgens G (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122(1), 87-96.

Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N *et al.* (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Mol. Cell* 13, 599-609.

Lee DY, Teyssier C, Strahl BD and Stallcup M (2005b). Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Res.* 26, 147–170.

Levy YY, Mesnage S, Mylne JS, Gendall AR and Dean C (2002). Multiple roles of *Arabidopsis* VRN1 in vernalization and flowering time control. *Science* 297, 243–46.

Li B and Carey M, Workman JL (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707–19.

Li J, Brader G and Palva ET (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* 16, 319-331.

Li W, Chen C, Markmann-Mulisch U, Timofejeva L, Schmelzer E, Ma H and Reiss B (2004). The *Arabidopsis* *AtRAD51* gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 101, 10596-10601.

Li X, Wang X, He K, Ma Y, Su N, He H, Stolc V, Tongprasit W, Jin W, Jiang J, Terzaghi W, Li S and Deng XW (2008). High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. *The Plant Cell* 20, 259-276.

Li Y, Kao GD, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Qin J, Phelan C and Lazar MA (2006). A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes. Dev.* 20(18), 2566-79.

Liang YK, Wang Y, Zhang Y, Li SG, Lu XC *et al.* (2003). OsSET1, a novel SET-domain-containing gene from rice. *J. Exp. Bot.* 54, 1995–96.

Libault M, Tessadori F, Germann S, Snijder B, Fransz P and Gaudin V (2005). The *Arabidopsis* LHP1 protein is a component of euchromatin. *Planta* 222, 910–925.

- Lichten M (2001). Meiotic recombination: breaking the genome to save it. *Curr. Biol.* 11, R253-256.
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM *et al.* (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292, 2077–80.
- Lindroth AM, Shultis D, Jasencakova Z, Fuchs J, Johnson L *et al.* (2004). Dual histone H3 methylation marks at lysines 9 and 27 required for interaction with CHROMOMETHYLASE3. *EMBOJ.* 23, 4286–96.
- Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N *et al.* (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430, 471–76.
- Lippman Z, May B, Yordan C, Singer T and Martienssen R (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol.* 1, E67.
- Liu C, Lu F, Cui X and Cao X (2010). Histone Methylation in Higher Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 395–420.
- Liu CM, McElver J, Tzafrir I, Joosen R, Wittich P, Patton D, Van Lammeren AA and Meinke D (2002a). Condensin and cohesin knockouts in *Arabidopsis* exhibit a titan seed phenotype. *Plant J.* 29, 405-415.
- Liu J and Qu L-J (2008). Meiotic and Mitotic Cell Cycle Mutants Involved in Gametophyte Development in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 1(4), 564–574.
- Liu S, Yu Y, Ruan Y, Meyer D, Wolff M *et al.* (2007). Plant SET- and RING-associated domain proteins in heterochromatinization. *Plant J.* 52, 914–26.
- Liu Z and Makaroff CA (2006). *Arabidopsis* separase AESP Is essential for embryo development and the release of cohesin during meiosis. *The Plant Cell* 18,1213–1225.
- Lohmiller LD, De Muyt A, Howard B, Offenberger HH, Heyting C, Grelon M and Anderson LK (2008). Cytological analysis of MRE11 protein during early meiotic prophase I in *Arabidopsis* and tomato. *Chromosoma* 117(3), 277-88.
- Loidl P (2004). A plant dialect of the histone language. *Trends Plant Sci.* 9(2), 84-90.
- Long JA, Ohno C, Smith ZR and Meyerowitz EM (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. *Science* 312(5779), 1520-3.
- Lu F, Li G, Cui X, Liu C, Wang XJ and Cao X (2008). Comparative analysis of JmjC domain-containing proteins reveals the potential histone demethylases in *Arabidopsis* and rice. *J. Integr. Plant Biol.* 50, 886–96.
- Lu XC, Gong HQ, Huang ML, Bai SL, He YB, Mao X, Geng Z, Li SG, Wei L, Yuwen JS, Xu ZH and Bai SN (2006). Molecular analysis of early rice stamen development using organ specific gene expression profiling. *Plant Mol. Biol.* 61, 845-851.

- Lund AH and van Lohuizen M (2004). Polycomb complexes and silencing mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 239–246.
- Luo M, Platten D, Chaudhury A, Peacock WJ and Dennis ES (2009). Expression, imprinting, and evolution of rice homologs of the polycomb group genes. *Mol. Plant* 2, 711–23.
- Lusser A (2002). Acetylated, methylated, remodeled: chromatin states for gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5(5), 437–43.
- Ma H (2006). A molecular portrait of *Arabidopsis* meiosis. The *Arabidopsis* book edited by American Society of Plant Biologists, 1–39.
- Ma J, Skibbe DS, Fernandes J and Walbot V (2008). Male reproductive development: gene expression profiling of maize anther and pollen ontogeny. *Genome Biol.* 9, R181.
- Macdonald N, Welburn JP, Noble ME, Nguyen A, Yaffe MB, Clynes D, Moggs JG, Orphanides G, Thomson S, Edmunds JW *et al.* (2005). Molecular basis for the recognition of phosphorylated and phosphoacetylated histone h3 by 14-3-3. *Mol. Cell* 20, 199–211.
- Makarevich G, Leroy O, Akinci U, Schubert D, Clarenz O *et al.* (2006). Different Polycomb group complexes regulate common target genes in *Arabidopsis*. *EMBO Rep.* 7, 947–52.
- Malagnac F, Bartee L and Bender J (2002). An *Arabidopsis* SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *EMBO J.* 21, 6842–52.
- Mao Y, Pavangadkar KA, Thomashow MF and Triezenberg SJ (2006). Physical and functional interactions of *Arabidopsis* ADA2 transcriptional coactivator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1. *Biochim. Biophys. Acta.* 1759(1-2), 69–79.
- Margueron R, Trojer P and Reinberg D (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 163–176.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, Berka J *et al.* (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437(7057), 376–80.
- Martin C and Zhang Y (2005). The diverse functions of histone lysine methylation, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 838–849.
- May BP, Lippman ZB, Fang Y, Spector DL and Martienssen RA (2005). Differential regulation of strand-specific transcripts from *Arabidopsis* centromeric satellite repeats. *PLoS Genet.* 1(6), e79.
- Mazina OM, Mazin AV, Nakagawa T, Kolodner RD and Kowalczykowski SC (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 helicase stimulates 3'-5' heteroduplex extension by Rad51; implications for crossover control in meiotic recombination. *Cell* 117, 47–56.

- McGuinness BE, Hirota T, Kudo NR, Peters JM and Nasmyth K (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biol.* 3(3), e86.
- McKim KS, Green-Marroquin BL, Sekelsky JJ, Chin G, Steinberg C, Khodosh R and Hawley RS (1998). Meiotic synapsis in the absence of recombination. *Science* 279, 876-878.
- Mercier R, Armstrong SJ, Horlow C, Jackson NP, Makaroff CA, Vezon D, Pelletier G, Jones GH and Franklin FCH (2003). The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in *Arabidopsis*. *Development* 130, 3309-3318.
- Mercier R, Grelon M, Vezon D, Horlow C and Pelletier G (2001a). How to characterize meiotic functions in plants? *Biochimie.* 3, 1023-1028.
- Mercier R, Vezon D, Bullier E, Motamayor JC, Sellier A, Lefevre F, Pelletier G and Horlow C (2001). SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes Dev.* 15, 1859-1871.
- Merker JD, Dominska M, Greewell PW, Rinella E, Bouck DC, Shibata Y, Strahl BD, Mieczkowski P and Petes TD (2008). The histone methylase Set2p and the histone deacetylase Rpd3p repress meiotic recombination at the HIS4 meiotic recombination hotspot in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 7, 1298–1308.
- Metivier R, Penot G, Hubner MR, Reid G, Brand H, Kos M, and Gannon F (2003). Estrogen receptor- $\alpha$  directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751–763.
- Mieczkowski PA, Dominska M, Buck MJ, Lieb JD and Petes TD (2007). Loss of a histone deacetylase dramatically alters the genomic distribution of Spo11p-catalyzed DNA breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6, 3955-3960.
- Mizuno K, Emura Y, Baur M, Kohli J, Ohta K and Shibata T (1997). The meiotic recombination hot spot created by the single-base substitution ade6-M26 results in remodeling of chromatin structure in fission yeast. *Genes Dev.* 11, 876–886.
- Mizuno K, Hasemi T, Ubukata T, Yamada T, Lehmann E, Kohli J, Watanabe Y, Lino Y, Yamamoto M, Fox ME, Smith GR, Murofushi H, Shibata T and Ohta K (2001). Counteracting regulation of chromatin remodeling at a fission yeast CRE-related recombination hotspot by SAPK, cAMP-dependent kinase, and meiosis regulators. *Genetics* 159, 1467–1478.
- Moon YH, Chen L, Pan RL, Chang HS, Zhu T *et al.* (2003). EMFgenes maintain vegetative development by repressing the flower program in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15, 681–93.
- Morris CA and Moazed D (2007). Centromere assembly and propagation. *Cell* 128(4), 647-50.
- Munshi A, Shafi G, Aliya N and Jyothy A (2009). Histone modifications dictate specific biological readouts. *J. Genet. Genomics* 36, 75-88.



Murfett J, Wang XJ, Hagen G and Guilfoyle TJ (2001). Identification of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 mutants that affects transgene expression. *Plant Cell* 13, 1047-1061.

Mylne JS, Barrett L, Tessadori F, Mesnage S, Johnson L *et al.* (2006). LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 5012–17.

Nag DK and Petes TD (1993). Physical detection of heteroduplexes during meiotic recombination in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13, 2324–2331.

Nagashima T, Maruyama T, Furuya M, Kajitani T, Uchida H, Masuda H, Ono M, Arase T, Ozato K and Yoshimura Y (2007). Histone acetylation and subcellular localization of chromosomal protein BRD4 during mouse oocyte meiosis and mitosis *Mol. Hum. Reprod.* 13(3), 141–148.

Nakagaw T and Ogawa H (1999). The *Saccharomyces cerevisiae* MER3 gene, encoding a novel helicase-like protein, is required for crossover control in meiosis. *EMBO J.* 18, 5714-5723.

Nakagawa T and Kolodner RD (2002a). *Saccharomyces cerevisiae* Mer3 is a DNA helicase involved in meiotic crossing over. *Mol. Cell Biol.* 22, 3281-3291.

Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD and Grewal SI (2001). Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* 292, 110–113.

Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA and Schnable PS (2003). Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* 15, 583–596.

Nathan D, Ingvarsdottir K, Sterner DE, Bylebyl GR, Dokmanovic M, Dorsey JA, Whelan K.A, Krsmanovic M, Lane WS, Meluh PB *et al.* (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive acting histone modifications. *Genes Dev.* 20, 966–976.

Nelson CJ, Santos-Rosa H and Kouzarides T (2006). Proline isomerization of histone H3 regulates lysine methylation and gene expression. *Cell* 126, 905–916.

Nelson TM, Tausta SL, Gandotra N, and Liu T (2006). Laser microdissection of plant tissue: what you see is what you get. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 181-201.

Ng DW-K, Wang T, Chandrasekharan MB, Aramayo R, Kertbundit S and Hall TC (2007). Plant SET domain-containing proteins: Structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 316–329.

Nishio H and Walsh MJ (2004). CCAAT displacement protein/cut homolog recruits G9a histone lysine methyltransferase to repress transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 11257–11262.

Noh B, Lee SH, Kim HJ, Yi G, Shin EA *et al.* (2004). Divergent roles of a pair of homologous jumonji/zinc-finger-class transcription factor proteins in the regulation of *Arabidopsis* flowering time. *Plant Cell* 16, 2601–13.

- Nonomura KI, Nakano M, Fukuda T, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H and Kurata N (2004). The novel gene *HOMOLOGOUS PAIRING ABERRATION IN RICE MEIOSIS 1* of rice encodes a putative coiled-coil protein required for homologous chromosome pairing in meiosis. *Plant Cell* 16, 1008-1020.
- Novak JE, Ross-Macdonald PB and Roeder GS (2001). The budding yeast Msh4 protein functions in chromosome synapsis and the regulation of crossover distribution. *Genetics* 158, 1013-1025.
- Ogawa H, Ishiguro K, Gaubatz S, Livingston DM and Nakatani Y (2002). A complex with chromatin modifiers that occupies E2F- and Myc-responsive genes in G0 cells. *Science* 296, 1132-1136.
- Ohta K, Shibata T and Nicolas A (1994). Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *EMBO J.* 13, 5754-5763.
- Ohyama H, Mahadevappa M, Luukkaa H, Todd R, Warrington JA and Wong DTW (2002). Use of laser capture microdissection-generated targets for hybridization of high-density oligonucleotide arrays. *Methods Enzymol.* 356, 323-333.
- Okada Y, Scott G, Ray M K, Mishina Y and Zhang Y (2007). Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 450, 119-123.
- Opel M, Lando D, Bonilla C, Trewick SC, Boukaba A, Walfridsson J, Cauwood J, Werler PJ, Carr AM, Kouzarides T *et al.* (2007). Genomewide studies of histone demethylation catalysed by the fission yeast homologues of mammalian LSD1. *PLoS ONE* 2, e386.
- Orr-Weaver TL (1999). The ties that bind: Localization of the sister-chromatid cohesin complex on yeast chromosomes. *Cell* 99, 1-4.
- Osman F, Dixon J, Doe CL, Whitby MC. (2003). Generating crossovers by resolution of nicked Holliday junctions: a role for Mus81-Eme1 in meiosis. *Mol. Cell* 12, 761-774.
- Otegui MS and Staehelin LA (2004). Electron tomographic analysis of post-meiotic cytokinesis during pollen development in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 218, 501-515.
- Page AW and Orr-Weaver TL (1997). Stopping and starting the meiotic cell cycle. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7(1), 23-31.
- Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW and Jorgensen RA (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 30, 5036-5055.
- Perrella G, Consiglio F, Aiese Cigliano R, Barra L, Cremona G, Sanchez-Moran E, Errico A, Bressan R, Franklin FCH and Conicella C (2010). Histone hyperacetylation affects meiotic chromosome condensation, segregation, and chiasma distribution in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62. 796-806.

Peters AH, O'Carroll D, Scherthan H, Mechtler K, Sauer S, Schofer C, Weipoltshammer K, Pagani M, Lachner M, Kohlmaier A, Opravil S, Doyle M, Sibilia M and Jenuwein T (2001). Loss of the Suv39h histone methyltransferases impairs mammalian heterochromatin and genome stability. *Cell* 107, 323–337.

Petruk S, Sedkov Y, Smith S, Tillib S, Kraevski V, Nakamura T, Canaani E, Croce CM and Mazo A (2001). Trithorax and dCBP acting in a complex to maintain expression of a homeotic gene. *Science* 294, 1331–1334.

Pfluger J and Wagner D (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10(6),645-52.

Pidoux AL and Allshire RC (2005). The role of heterochromatin in centromere function. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 360(1455), 569-79.

Pien S and Grossniklaus U (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 375–82.

Pien S, Fleury D, Mylne J, Crevillen P, Inze D, Avramova Z, Dean C and Grossniklaus U (2008). Unraveling trithorax functions in plants: ATX1 dynamically regulates the activation of *FLC* via histone H3 lysine 4 trimethylation. *The Plant Cell* 20, 580-588.

Pokholok DK, Zeitlinger J, Hannett NM, Reynolds DB and Young RA (2006). Activated signal transduction kinases frequently occupy target genes. *Science* 313, 533–536.

Ponticelli AS, Sena EP and Smith GR (1988). Genetic and physical analysis of the M26 recombination hotspot of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 119, 491–497.

Portillo M, Lindsey K, Casson S, Garcia-Casado G, Solano R, Fenoll C and Escobar C (2009). Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. *Mol. Plant Pathol.* 10(4), 523-535.

Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR and Grant PA (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434–438.

Probst AV, Fagard M, Proux F, Mourrain P, Boutet S, Earley K *et al.* (2004). *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell* 16, 1021-1034.

Przemeck G, Mattsson J, Hardtke C, Sung Z and Berleth T (1996). Studies on the role of *Arabidopsis* gene MONOPTEROS in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 200, 229-237.

Puizina J, Siroky J, Mokros P, Schweizer D and Riha K (2004). Mre11 deficiency in *Arabidopsis* is associated with chromosomal instability in somatic cells and Spo11-dependent genome fragmentation during meiosis. *Plant Cell* 16, 1968-1978.

Qin S and Parthun MR (2006). Recruitment of the type B histone acetyltransferase Hat1p to chromatin is linked to DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* 26, 3649–3658.

Rabitsch KP, Petronczki M, Javerzat JP, Genier S, Chwalla B, Schleiffer A, Tanaka TU and Nasmyth K (2003). Kinetochore recruitment of two nucleolar proteins is required for homolog segregation in meiosis I. *Dev. Cell.* 4, 535–548.

Raynaud C, Sozzani R, Glab N, Domenichini S, Perennes C, Cella R, Kondorosi E and Bergounioux C (2006). Two cell-cycle regulated SET-domain proteins interact with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in *Arabidopsis*. *Plant J.* 47, 395-407.

Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl B, Sun Z-W, Schmidt M, Opravil S, Mechtler K, Pontig C, Allis DC and Jenuwein T (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.

ReddyTV, Kaur J, Agashe B, Sundaresan V and Siddiqi I (2003). The DUET gene is necessary for chromosome organization and progression during male meiosis in *Arabidopsis* and encodes a PHD finger protein. *Development* 130, 5975-5987.

Reuben M and Lin R (2002). Germline X chromosomes exhibit contrasting patterns of histone H3 methylation in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 245, 71-82.

Riehs N, Akimcheva S, Puizina J, Bulankova P, Idol RA, Siroky J, Schleiffer A, Schweizer D, Shippen DE, Riha K (2008). *Arabidopsis* SMG7 protein is required for exit from meiosis. *J. Cell Sci.* 121(Pt 13), 2208-16.

Riggs CD, Zeman K, DeGuzman R, Rzepczyk A and Taylor AA (2001). Antisense inhibition of a tomato meiotic proteinase suggests functional redundancy of proteinases during microsporogenesis *Genome* 44, 644–650.

Rine J and Herskowitz I (1987). Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 116, 9-22.

RJ Sims III, K Nishioka, D Reinberg (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet.* 19, 629–639.

Roeder GS (1990). Chromosome synapsis and genetic recombination: their roles in meiotic chromosome segregation. *Trends Genet.* 6, 385-389.

Roguev A, Schaft D, Shevchenko A, Pijnappel WW, Wilm M, Aas R and AF Stewart (2001). The *Saccharomyces cerevisiae* Set1 complex includes an Ash2 homologue and methylates histone 3 lysine 4, *EMBO J.* 20, 7137–7148.

Romanienko PJ and Camerini-Otero RD (1999). Cloning, characterization, and localization of mouse and human SPO11. *Genomics* 61, 156-169.

Roopra A, Qazi R, Schoenike B, Daley TJ and Morrison JF (2004). Localized domains of G9a-mediated histone methylation are required for silencing of neuronal genes. *Mol. Cell* 14, 727–738.

Ross KJ, Fransz P and Jones GH (1996). A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. Chromosome Res. 4, 507-516.

Ross KJ, Fransz P, Armstrong SJ, Vizir I, Mulligan B, Franklin FCH and Jones GH (1997). Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. Chromosome Res. 5, 551-559.

Rudolph T, Yonezawa M, Lein S, Heidrich K, Kubicek S, Schafer C, Phalke S, Walther M, Schmidt A, Jenuwein T *et al.* (2007). Heterochromatin formation in drosophila is initiated through active removal of H3K4 methylation by the LSD1 homolog SU(VAR)3-3. Mol. Cell 26, 103-115.

Saleh A, Al-Abdallat A, Ndamukong I, Alvarez-Venegas R and Avramova Z (2007). ATX1 and CLF Establish a Bivalent Chromatin Mark at the Silenced *AGAMOUS* Locus in *Arabidopsis*. Nucl. Acids. Res. 35, 6290-6296.

Saleh A, Alvarez-Venegas R, Yilmaz M, Le O, Hou G, Sadler M, Al-Abdallat A, Xia Y, Lu G, Ladunga I and Avramova Z (2008b). The highly similar *ARABIDOPSIS HOMOLOGS OF TRITHORAX ATX1* and *ATX2* encode divergent biochemical functions. The Plant Cell 20, 568-579.

Sambrook J and Russell DW (2001). Molecular cloning: A laboratory manual. CSHL Press.

Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu YC, Lee PY, Truong MH, Beals PB and Goldberg RB (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. Sex. Plant Reprod. 11, 297-322.

Sanders SL, Portoso M, Mata J, Bahler J, Allshire RC and Kouzarides T (2004). Methylation of histone H4 lysine 20 controls recruitment of Crb2 to sites of DNA damage. Cell 119, 603-614.

Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister A, Sherriff J, Bernstein BE, Emre T, Schreiber SL, Mellor J and Kouzarides T (2002). Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. Nature 419, 407-411.

Saze H, Shiraishi A, Miura A and Kakutani T (2008). Control of genic DNA methylation by a jmjC domain-containing protein in *Arabidopsis thaliana*. Science 319, 462-65.

Schaner CE and Kelly WG (2006). Germline chromatin. WormBook 1-14, [www.wormbook.org](http://www.wormbook.org).

Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Schölkopf B, Weigel D and Lohmann JU (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. Nat. Genet. 37(5), 501-6.

Schommer C, Beven A, Lawrenson T, Shaw P and Sablowski, R (2003). AHP2 is required for bivalent formation and for segregation of homologous chromosomes in *Arabidopsis* meiosis. *Plant J.* 36, 1-11.

Schonrock N, Bouveret R, Leroy O, Borghi L, Kohler C *et al.* (2006). Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway. *Genes Dev.* 20, 1667–78.

Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D and Jenuwein T (2004). A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. *Genes Dev.* 18, 1251-1262.

Schubert D, Primavesi L, Bishopp A, Roberts G, Doonan J *et al.* (2006). Silencing by plant Polycombgroup genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *EMBO J.* 25, 4638–49.

Schuermann D, Molinier J, Fritsch O and Hohn B (2005). The dual nature of homologous recombination in plants. *Nature* 21(3), 172-181.

Schwacha A and Kleckner N (1997). Interhomolog bias during meiotic recombination: meiotic functions promote a highly differentiated interhomolog-only pathway. *Cell* 90, 1123-1135.

Schwartz YB and Pirrotta V (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* 8(1), 9-22.

Schwarzacher T. (2003). Meiosis, recombination and chromosomes: a review of gene isolation and fluorescent in situ hybridization data in plants. *J. Exp. Bot.* 54(380), 11-23.

Seward DJ, Cubberley G, Kim S, Schonewald M, Zhang L, Tripet B and Bentley DL (2007). Demethylation of trimethylated histone H3 Lys4 in vivo by JARID1 JmjC proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 240-242.

Sharma GG, So S, Gupta A, Kumar A, Cayrou C, Avvakumov N, Bhadra U, Pandita RK, Porteus MH, Chen DJ, Cote J and Pandita TK (2010). MOF and histone H4 acetylation at lysine 16 are critical for DNA damage response and double-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 30 (14), 3582-3595.

Sheldon CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA *et al.* (1999). The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* 11, 445–58.

Shen WH (2001). NtSET1, a member of a newly identified subgroup of plant SET-domain-containing proteins, is chromatin-associated and its ectopic overexpression inhibits tobacco plant growth. *Plant J.* 28, 371–83.

Shi X, Hong T, Walter KL, Ewalt M, Michishita E, Hung T, Carney D, Pena P, Lan F, Kaadige MR *et al.* (2006). ING2 PHD domain links histone H3 lysine 4 methylation to active gene repression. *Nature* 442, 96–99.

- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR *et al.* (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941–53.
- Shi Y, Sawada J, Sui G, Affar el B, Whetstine JR, Lan F, Ogawa H, Luke MP and Nakatani Y (2003). Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature* 422, 735–738.
- Shogren-Knaak M, Ishii H, Sun JM, Pazin MJ, Davie JR and Peterson CL (2006). Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* 311, 844–847.
- Siddiqui NU, Rusyniak S, Hasenkampf CA and Riggs C (2006). Disruption of the *Arabidopsis* SMC4 gene, AtCAP-C, compromises gametogenesis and embryogenesis. *Planta* 223(5), 990-7.
- Siddiqui NU, Stronghill PE, Dengler RE, Hasenkampf CA and Riggs CD (2003). Mutations in *Arabidopsis* condensin genes disrupt embryogenesis, meristem organization and segregation of homologous chromosomes during meiosis. *Development* 130, 3283-3295.
- Smith J, and Boeke J. (1997). An unusual form of transcriptional silencing in yeast ribosomal DNA. *Genes Dev.* 11, 241-254.
- Smith KC and Wang, TC (1989). recA-dependent DNA repair processes. *Bioessays* 10, 12-16.
- Smith KC, Wang TV and Sharma RC (1987). RECA-dependent DNA repair in UV-irradiated *Escherichia coli*. *J. Photochem. Photobiol. B* 1, 1-11.
- Smith ST, Petruk S, Sedkov Y, Cho E, Tillib S, Canaani E and Mazo A (2004). Modulation of heat shock gene expression by the TAC1 chromatin modifying complex. *Nat. Cell Biol.* 6, 162–167.
- Snowden T, Acharya S, Butz C, Berardini M and Fishel R (2004). hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol. Cell* 15, 437-451.
- Spedaletti V, Polticelli F, Capodaglio V, Schinina ME, Stano P *et al.* (2008). Characterization of a lysinespecific histone demethylase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 47, 4936–47.
- Spielman M, Preuss D, Li FL, Browne WE, Scott RJ and Dickinson HG (1997). *TETRASPORE* is required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 124, 2645-2657.
- Springer NM, Napoli CA, Selinger DA, Pandey R, Cone KC *et al.* (2003). Comparative analysis of SET domain proteins in maize and *Arabidopsis* reveals multiple duplications preceding the divergence of monocots and dicots. *Plant Physiol.* 132, 907–25.
- Sridha S and Wu K (2006). Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 46, 124-133.

Stacey NJ, Kuromori T, Azumi Y, Roberts G, Breuer C, Wada T, Maxwell A, Roberts K and Sugimoto-Shirasu K (2006). *Arabidopsis* SPO11-2 functions with SPO11-1 in meiotic recombination. *Plant J.* 48, 206-216.

Stack SM and Anderson LK (2001). A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chromosome Res.* 9, 175-198.

Stahl FW, Foss HM, Young LS, Borts RH, Abdullah MF and Copenhaver GP (2004). Does crossover interference count in *Saccharomyces cerevisiae*? *Genetics* 168, 35-48.

Stassen NY, Logsdon Jr JM, Vora GJ, Offenberg HH, Palmer JD and Zolan ME (1997). Isolation and characterization of rad51 orthologs from *Coprinus cinereus* and *Lycopersicon esculentum*, and phylogenetic analysis of eukaryotic recA homologs. *Curr. Genet.* 31, 144-157.

Stockinger EJ, Mao Y, Regier MK, Triezenberg SJ and Tomashow MF (2001). Transcriptional adaptor and histone acetyltransferase proteins in *Arabidopsis* and their interactions with CBF1, a transcriptional activator involved in cold-regulated gene expression. *Nucleic. Acid Res.* 29, 1524-1533.

Strahl BD and Allis CD (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.

Sullivan BA and Karpen GH (2004). Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 1076-1083.

Sun Q and Zhou DX (2008). Rice jmjC domain-containing gene JMJ706 encodes H3K9 demethylase required for floral organ development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 13679-84.

Sung S and Amasino RM (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427, 159-64.

Sung S, He Y, Eshoo TW, Tamada Y, Johnson L *et al.* (2006). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat. Genet.* 38, 706-10.

Sung S, Schmitz RJ and Amasino RM. (2006). A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20, 3244-48.

Sung ZR, Belachew A, Shunong B and Bertrand-Garcia R (1992). EMF, an *Arabidopsis* gene required for vegetative shoot development. *Science* 258, 1645-47.

Szankasi P, Heyer WD, Schuchert P and Kohli J (1988). DNA sequence analysis of the ade6 gene of *Schizosaccharomyces pombe*. Wildtype and mutant alleles including the recombination hot spot allele ade6-M26. *J. Mol. Biol.* 204, 917-925.

Székvölgyi L and Nicolas A (2010). From meiosis to postmeiotic events: homologous recombination is obligatory but flexible. *FEBS J.* 277, 571-589.



Szostak JW, Orr-Weaver TL, Rothstein RJ and Stahl FW (1983). The double-strand-break repair model for recombination. *Cell* 33, 25-35.

Tachibana M, Nozaki M, Takeda N and Shinkai Y (2007). Functional dynamics of H3K9 methylation during meiotic prophase progression. *The EMBO J.* 26, 3346-3359.

Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T and Shinkai Y (2001). Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *J. Biol. Chem.* 276, 25309–25317.

Taddei A, Maison C, Roche D and Almouzni G. (2001). Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.* 3, 114–120.

Takeda K and Sugiura T (2000). Molecular defects in hormone receptors and G proteins in human disorders. *Rinsho. Byori.* 2000 48(5), 396-408.

Tanaka M, Kituchi A and Kamada H (2008). The *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol.* 146, 149-161.

Tang L-S, Wang Q, Xiong B, Hou Y, Zhang Y-Z, Sun Q-Y and Wang Y (2007). Dynamic changes in histone acetylation during sheep oocyte maturation. *J. Reprod. Dev.* 53(3), 555-561.

Tang X, Zhang Z-Y, Zhang W-J, Zhao X-M, Li X, Zhang D, Liu Q-Q and Tang W-H (2010). Global gene profiling of laser-captured pollen mother cells indicates molecular pathways and gene subfamilies involved in rice meiosis. *Plant Physiol. Preview.* DOI:10.1104/pp.110.161661

Tauton J, Hassig CA and Schreiber SL (1996). A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator of Rpd3p. *Science* 272, 408-411.

Thakur JK, Malik MR, Bhatt V, Reddy MK, Sopory SK *et al.* (2003). A POLYCOMB group gene of rice (*Oryza sativa* L. subspecies *indica*), OsIEZ1, codes for a nuclear-localized protein expressed preferentially in young seedlings and during reproductive development. *Gene* 314, 1–13.

Thorstensen T, Fischer A, Sandvik SV, Johnsen SS, Grini PE *et al.* (2006). The *Arabidopsis* SUV4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9. *Nucleic. Acids Res.* 34, 5461–70.

Tian L and Chen ZJ (2001). Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 200–205.

Tian L, Fong MP, Wang JJ, Wei NE, Jiang H, Doerge RW *et al.* (2005). Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics* 169, 337-345.

Tian L, Wang J, Fong MP, Chen M, Cao H, Gelvin SB and Chen ZJ (2003). Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis Histone Deacetylase 1 (AtHD1)*. *Expression Genetics* 165, 399–409.

Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH *et al.* (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* 439, 811–16.

Tuner JM (2007). Meiotic sex chromosome inactivation. *Development* 134, 1823-1831.

Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette ML, Guillaume E *et al.* (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet.* 3, e86.

Uanschou C, Siwiec T, Pedrosa-Harand A, Kerzendorfer C, Sanchez-Moran E, Novatchkova M, Akimcheva S, Woglar A, Klein F and Schlögelhofer P (2007). A novel plant gene essential for meiosis is related to the human *CtIP* and the yeast *COM1/SAE2* gene. *EMBO J.* 26, 5061-5070.

Ueno RT, Ishikawa T, Watanabe K, Teratura S, Iwakawa H, Okada K *et al.* (2007). Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES are involved in the establishment of polarity in leaf of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 445-457.

Vagnarelli P, Hudson DF, Ribeiro SA, Trinkle-Mulcahy L, Spence JM, Lai F, Farr CJ, Lamond AI and Earnshaw WC (2006). Condensin and Repo-Man-PP1 co-operate in the regulation of chromosome architecture during mitosis. *Nat. Cell Biol.* 8(10), 1133-42.

Vaillant I and Paszkowski J (2007). Role of histone and DNA methylation in gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10, 528–33.

Vakoc CR, Mandat S.A, Olenchock BA and Blobel GA (2005). Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* 19, 381–391.

Van Attikum H, Fritsch O, Hohn B and Gasser SM (2004). Recruitment of the INO80 complex by H2A phosphorylation links ATP-dependent chromatin remodeling with DNA double-strand break repair. *Cell* 119, 777–788.

van Heemst D and Heyting C (2000). Sister chromatid cohesion and recombination in meiosis. *Chromosoma* 109, 10-26.

Vaquero A, Scher MB, Lee DH, Sutton A, Cheng HL, Alt FW, Serrano L, Sternglanz R and Reinberg D (2006). SirT2 is a histone deacetylase with preference for histone H4 Lys 16 during mitosis. *Genes Dev.* 20, 1256–1261.

Verdin E, Franck Dequiedt F and Herbert GK (2003). Class II histone deacetylases: Versatile regulators. *Trends Genet.* 19, 286-93.

Vidal M and Gaber RF (1991). RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 11, 6317-6327.

Vignard J, Siwiec T, Chelysheva L, Vrielynck N, Gonord F, Armstrong SJ, Schlögelhofer P, Mercier R (2007). The Interplay of RecA-related Proteins and the MND1–HOP2 Complex during Meiosis in *Arabidopsis thaliana*. PLoS Genet. 3(10), 1894-1906.

Vlachonasios KE, Thomashow MF and Triezenberg SJ (2003). Disruption mutations of *ADA2b* and *GCN5* transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. Plant Cell 15, 626–638.

Volkel P and Angrand PO (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. Biochimie. 89, 1–20.

Wako T, Murakami Y and Fukui K (2005). Comprehensive analysis of dynamics of histone H4 acetylation in mitotic barley cells. Genes Genet. Syst. 80, 269-276.

Wang D, Tyson MD, Jackson SS and Yadegari R (2006). Partially redundant functions of two SET-domain polycomb-group proteins in controlling initiation of seed development in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 13244–49.

Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS and Zhang Y (2004a). Role of histone H2A ubiquitination in Polycomb silencing. Nature 431, 873–878.

Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y and Zhang Y (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. Mol. Cell 22, 383–394.

Wang Q, Yin S, Ai J, Liang CG, Hou Y, Chen DY, Schatten H and Sun QY (2006). Histone deacetylation is required for orderly meiosis. Cell Cycle 5, 766-774.

Wang X (2004). Lipid signaling. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 329-336.

Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee YH, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner L.S, McDonald CH, Cook RG, Dou Y *et al.* (2004b). Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. Science 306, 279–283.

Wang Y and Yang M (2006). The *ARABIDOPSIS* SKP1-LIKE1 (ASK1) protein acts predominately from leptotene to pachytene and represses homologous recombination in male meiosis. Planta 223, 613–617.

Watanabe Y and Nurse P (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. Nature 400, 461-464.

Weigel D and Glazerbrook (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Edited by Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Whetstone JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M *et al.* (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. Cell 125, 467-481.

Whitby MC (2005). Making crossovers during meiosis. Bioch. Soc. Trans. 33, 1451-1455.

Wood CC, Robertson M, Tanner G, Peacock WJ, Dennis ES and Helliwell CA. 2006. The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a polycomb-like protein complex that

also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 14631–36.

Woodbury EL and Morgan DO (2007). Cdk and APC activities limit the spindle-stabilizing function of Fin1 to anaphase. Nat. Cell Biol. 9(1), 106-12.

Wu K, Tian L, Malik K, Brown D and Miki B (2000). Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 22:19-27.

Wu K, Tian L, Malik K, Brown D and Miki B (2000a). Functional analysis of aRPD3 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 44, 167-176.

Wu K, Tian L, Zhou C., Brown D, Miki B (2003). Repression of gene expression by *Arabidopsis* HD2 histone deacetylase homologue HD2 histone deacetylase. Plant J. 34, 241-247.

Wu K, Zhang L, Zhou C, Yu C-W and Chaikam V (2008). HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. J. Exp. Bot. 59, 2, 225–234.

Wu TC and Lichten M (1994). Meiosis-induced double strand break sites determined by yeast chromatin structure. Science 263, 515-518.

Xu CR, Liu C, Wang YL, Li LC, Chen WQ, Xu ZH *et al.* (2005). Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the *Arabidopsis* root epidermis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 14469-14474.

Xu F, Zhang Q, Zhang K, Xie W and Grunstein M (2007). Sir2 deacetylates histone H3 lysine 56 to regulate telomeric heterochromatin structure in yeast. Mol. Cell 27, 890-900.

Xu L, Zhao Z, Dong A, Soubigou-Taconnat L, Renou JP, *et al.* (2008). Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. Mol. Cell Biol. 28, 1348–60.

Xu SX, Liu GS and Chen RD (2006). Characterization of an anther- and tapetum-specific gene and its highly specific promoter isolated from tomato. Plant Cell Rep. 25, 231-240.

Yamada T, Mizuno K, Hirota K, Kon N, Wahls WP, Hartsuiker E, Murofushi H, Shibata T and Ohta K (2004). Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. Embo J. 23, 1792-1803.

Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M and Watanabe Y (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. Nature 455(7210), 251-5.

Yang C-H, Chen L-J and Sung ZR (1995). Genetic regulation of shoot development in *Arabidopsis*: role of the *EMF* genes. Dev. Biol. 169, 421–435.

Yang CY, Spielman M, Coles JP, Li Y, Ghelani S, Bourdon V, Brown RC, Lemmon BE, Scott RJ and Dickinson HG (2003). *TETRASPORE* encodes a kinesin required for male meiotic cytokinesis in *Arabidopsis*. Plant J. 34, 229-240.

Yang M, Hu Y, Lodhi M, Mc Combie WR and Ma H (1999). The *Arabidopsis* *SKP1-LIKE1* gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11416-11421.

Yang X, Boateng KA, Strittmatter L, Burgess R and Makaroff CA (2009). *Arabidopsis* separase functions beyond the removal of sister chromatid cohesion during meiosis. *Plant Physiol.* 151, 323–333.

Yang X, Timofejeva L, Ma H and Makaroff CA (2006). The *Arabidopsis* SKP1 homolog ASK1 controls meiotic chromosome remodeling and release of chromatin from the nuclear membrane and nucleolus. *J. Cell Sci.* 119(Pt 18):3754-63.

Yin Y, Cheong H, Friedrichsen D, Zhao Y, Hu J, Mora-Garcia S and Chory J (2002). A crucial role for the putative *Arabidopsis* topoisomerase VI in plant growth and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10191-10196.

Yoshida N, Yanai Y, Chen L, Kato Y, Hiratsuka J, Miwa T, Sung ZR and Takahashi S (2001). EMBRYONIC FLOWER2, a novel Polycomb group protein homolog, mediates shoot development and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1973–1989.

Yu X, Li L, Guo M, Chory J and Yin Y (2008). Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by Jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 7618–23.

Yu Y, Dong A and Shen WH (2004). Molecular characterization of the tobacco SET domain protein NtSET1 unravels its role in histone methylation, chromatin binding, and segregation. *Plant J.* 40, 699–711.

Zalevsky j, MacQueen AJ, Duffy JB, Kempthues KJ and Villeneuve AM (1999). Crossing Over During *Caenorhabditis elegans* Meiosis Requires a Conserved MutS-Based Pathway That Is Partially Dispensable in Budding Yeast *Genetics* 153, 1271–1283.

Zhang H, Kobayashi R, Galaktionov K and Beach D (1995). p19Skp1 and p45Skp2 are essential elements of the cyclin A-CDK2 S phase kinase. *Cell* 82, 915-925.

Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M and Jacobsen SE (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* 10, R62.

Zhang X, Germann S, Blus BJ, Khorasanizadeh S, Gaudin V and Jacobsen SE (2007). The *Arabidopsis* LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 869–71.

Zhao DZ, Yang XH, Quan L, Timofejeva L, Rigel NW, Ma H and Makaroff CA (2006). ASK1, a SKP1 homolog, is required for nuclear reorganization, presynaptic homolog juxtaposition and the proper distribution of cohesin during meiosis in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 62, 99–110.

Zhao Z, Yu Y, Meyer D, Wu C and Shen WH (2005). Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nat. Cell Biol.* 7, 1256–60.

Zheng N, Schulman BA, Song L, Miller JJ, Jeffrey PD, Wang P, Chu C, Koepp DM, Elledge SJ, Pagano M, Conaway RC, Conaway JW, Harper JW and Pavletich NP (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* 416, 703-709.

Zhou C, Zhang L, Duan J, Miki B, Wu K (2005). Histone deacetylase19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 17, 1196-1204.

Zhou C, Labbe H, Sridha S, Wang L, Tian L, Latoszek-Green M *et al* . (2004). Expression and function of HD2-type histone deacetylases in *Arabidopsis* development. *Plant J.* 38, 715-724.

Zhou J, Wang X, He K, Charron J-BF, Elling AA and Deng XW (2010). Genome-wide profiling of histone H3 lysine 9 acetylation and dimethylation in *Arabidopsis* reveals correlation between multiple histone marks and gene expression. *Plant Mol. Biol.* DOI 10.1007/s11103-009-9594-7.

Zhu B, Zheng Y, Pham AD, Mandal SS, Erdjument-Bromage H, Tempst P and Reinberg D (2005). Monoubiquitination of human histone H2B: the factors involved and their roles in HOX gene regulation. *Mol. Cell* 20, 601–611.

Zickler D and Kleckner N (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annu. Rev. Genet.* 33, 603-754.

Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T and Henikoff S (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456, 125–129.

## APPENDICE

Cremona G, Aiese Cigliano R, Consiglio MF, Conicella C (2010). Epigenetic control of meiotic recombination. *Minerva Biotechnologica* 22(2), 25-26.

Aiese Cigliano R, **Cremona G**, Consiglio MF, Conicella C (2010). Functional biology in *Arabidopsis* to shed light on the molecular basis of  $2n$  gametes. *Minerva Biotechnologica* 22(2), 1-2.

Perrella G, Consiglio F, Aiese Cigliano R, Barra L, **Cremona G**, Sanchez-Moran E, Errico A, Bressan R, Franklin FCH and Conicella C (2010). Histone hyperacetylation affects meiotic chromosome condensation, segregation, and chiasma distribution in *Arabidopsis*. *Plant J.* 62, 796-806.

Cremona G, Aiese Cigliano R, Consiglio MF, Viotti A and Conicella C. Histone modification dynamics during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the 54th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Matera, Italy – 27/30 September, 2010 ISBN 978-88-904570-0-5. Poster Communication Abstract.

Aiese Cigliano R, Sanseverino W, **Cremona G**, Paparo R, Consiglio MF and Conicella C. Analysis of *PARALLEL SPINDLES-LIKE* gene family in plants. Proceedings of the 54th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Matera, Italy – 27/30 September, 2010 ISBN 978-88-904570-0-5. Poster Communication Abstract.

Aiese Cigliano R, Perrella G, **Cremona G**, Paparo R, Consiglio MF, Conicella C. Histone acetylation controls meiotic crossover distribution in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the 54th Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress Matera, Italy – 27/30 September, 2010 ISBN 978-88-904570-0-5  
Oral Communication Abstract.

**Cremona G**, Consiglio MF, Aiese Cigliano R and Conicella C Changes in histone acetylation during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*.. EMBO Conference on Meiosis (1<sup>st</sup>). 19-23 Settembre 2009, Isle sur la Sorgue, France.

Cremona G. Identification and functional analysis of meiotic genes in plant. VIII Corso di aggiornamento sulla genetica vegetale. 8-11 Giugno 2009, Assisi.

Aiese Cigliano R, Sanseverino W, **Cremona G**, Consiglio MF and Conicella C. FHA meets PINc : Analysis of *Parallel Spindles-Like* gene family in plants. (in preparation).

## Epigenetic control of meiotic recombination

G. CREMONA, R. ADÈSE CIGLIANO, M. E. CONSIGLIO, C. CONSCILLA

CNR-IGV, Research Institute of Plant Genetics,  
Research Division, Portici (NA), Italy

Meiosis is a specialized cell cycle, essential for the sexual reproduction of higher organisms. During meiosis, diploid committed cells give rise to haploid gametes through the halving of genome content determined by a single round of DNA replication followed by two successive divisions, reductional and equational. During the first division, which is unique to meiotic cells, homologous chromosomes segregate. A correct segregation requires the establishment of connections between homologs and this is mediated in most species by reciprocal recombination events known as crossing over (CO) initiated by programmed formation of double-strand breaks (DSBs). In addition, COs increase genome diversity by reshuffling alleles over generations, thereby improving the efficacy of natural selection.

In eukaryotic organisms, COs do not occur randomly along chromosomal DNA but rather are clustered in small regions of elevated recombination activity. These so-called "hotspots" are surrounded by regions that are essentially devoid of recombination. The factors that determine hotspot locations are poorly understood. However, some evidence is increasingly pointing out that hot spot location is influenced by local chromatin structure<sup>1</sup> and higher order chromosome structure.

Chromatin is made-up of histones and DNA, both of which may be modified to affect the way in which they interact. Histones are responsible for the coiling of DNA into nucleosome, the basic subunit of chromatin, and are composed of a globular domain and amino-terminal extensions known as histone tails which residues can be post-

translationally modified by methylation, acetylation, phosphorylation, ubiquitylation and sumoylation. These post-translational modifications alter chromatin structure by affecting the interactions of histones between adjacent nucleosomes or with DNA and/or by collectively establishing a code recognized by downstream effector proteins and complexes. Thus, histones modifications assist in the formation of either condensed heterochromatic states or open euchromatic states.

Purpose of this review is to describe the main histone modifications, acetylation and methylation, that so far were demonstrated to be associated with meiotic recombination.

### Histone acetylation and meiotic recombination

Histone acetylation was shown to be involved in meiotic recombination either by local analysis at hotspots in different organisms or by genome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. Enrichment of histone acetylation occurs in recombinationally active regions such as chicken immunoglobulin locus, fission yeast *ade6-M26* (M26) locus, budding yeast



HIS4 locus, and mouse hotspot *Psmb9*<sup>1</sup>. Deletion of a histone acetylase, *Spgcn5*, required for *ade6-M26* hotspot-specific hyperacetylation, led at this locus to a partial decrease in the DNA double-strand breaks (DSBs). Vice versa, loss-of-function of a histone deacetylase, *ScRpd3p*, increases *HIS4* hotspot activity. In *S. cerevisiae*, histone hyperacetylation changes the genomic distribution of meiosis-specific DSBs, elevating DSBs for 5% of yeast genes and reducing DSBs for 7% of the genes.

*Arabidopsis thaliana mcc1* (meiotic control of CO) mutant overexpressing a histone acetylase has revealed compelling evidence of a link between histone acetylation and meiotic recombination in plants, as well<sup>2</sup>. Hyperacetylation has a clear effect on COs although not univocal for all the chromosomes. Overall, elevated *MCC1* did not affect CO number per cell, but has a differential effect on individual chromosomes elevating COs for chromosome 4, in which there is also a shift in CO location, and reducing COs for chromosome 1 and 2. For the latter there is a loss of the obligate CO in 8% of the male meiocytes<sup>2</sup>.

### Histone methylation and meiotic recombination

The trimethylation of lysine 4 of histone H3 (H3K4me3) has been shown to define the location of initiation sites for COs in yeast and mouse<sup>1,3</sup>. Indeed, DSB formation at well characterized hotspots is strongly reduced in the absence of Set1, the only H3K4 methylase in yeast<sup>3</sup>. Rad6, which mediates methylation of H3K4 through ubiquitylation of the H2B lysine 123, is also required for full levels of meiotic DSBs.

In mouse, a high level of H3K4me3 was correlated with high recombination activity at two distinct hotspots. Mouse *Prdm9* gene has been shown to trimethylate H3K4 and to be expressed specifically in germ cells during meiotic prophase I. Several experiments indicate that *Prdm9* is a strong candidate as the *trans*-acting factor that controls hotspot acti-

vation in mice as well as the factor that specifically binds to the 13-bp consensus motif that is common to many human hotspots<sup>4</sup>. However, no equivalent consensus element has been identified for mouse hotspots. So far, new insights have been provided to explain the heterogeneous distribution of DSBs along the chromosomes although the evolution of recombination initiation sites seems to be different between organisms.

### Conclusions

Although incomplete, the understanding of the relationship between meiotic recombination and histone modifications is rapidly increasing in yeast and metazoans. Strong evidences converge on the histone methylation as mark that defines a substantial number of hotspots. In contrast, the role of histone modifications in meiotic recombination remains largely unexplored in plants. *Arabidopsis*, as model plant, and the collections of mutants affected in recombination process will surely help to fill this gap. As example, analysis of *dsy10* mutant, which blocks recombination as well as homologue pairing and synapsis, showed that histone H3 deacetylation and H3K4me2 are absent during the early prophase I when recombination occurs<sup>5</sup>.

### References

1. Buard J, Barthès P, Grey C, de Massy B. Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J* 2009;28:2636-24.
2. Perrella G, Consiglio MF, Aiese-Gigliano R, Cremona G, Sanchez-Moran E, Barra L, et al. Histone hyperacetylation affects meiotic recombination and chromosome segregation in *Arabidopsis*. *Plant J* 2010; DOI: 10.1111/j.1365-3113.2010.04191.x.
3. Boer V, Robine N, Lin W, Bonfils S, Géli V, Nicolas A. Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J* 2009;28:99-111.
4. Baudat F, Buard J, Grey C, Flodol-Alon A, Ober C, et al. PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* 2010;327:856-40.
5. Bouteng KA, Yang X, Dong F, Owen HA, Makaroff CA. SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. *Mol Plant* 2008;4:620-33.

## Functional biology in *Arabidopsis* to shed light on the molecular basis of $2n$ gametes

IL. AIESE CIGLIANO, G. CREMONA, M.F. CONSIGLIO, C. CONICILLA

CNR-IGV, Research Institute of Plant Genetics, Research Division, Portici, Portici, Italy

It has been estimated that 30%–80% of the angiosperms are polyploids, including important economic crops such as wheat, banana, cranberry, potato, and alfalfa<sup>1</sup>. Several works postulate that polyploids originated from unreduced ( $2n$ ) gametes through various meiotic nuclear restitution mechanisms, some of which were identified in potato<sup>2,3</sup>. The formation of  $2n$  gametes has a variable expressivity and is suggested to be a polygenic trait under the control of mutated major loci. The malfunction of such loci has different genetic consequences that can be equivalent to a First Division Restitution (FDR) or to a Second Division Restitution (SDR). FDR mechanisms lead to unreduced nuclei carrying non-sister chromatids, and, therefore, transmit a high level of heterozygosity to the progeny. On the contrary, SDR mechanisms lead to unreduced nuclei carrying sister chromatids and to a relatively high level of homozygosity in the progeny. Besides the role in polyploid plant evolution,  $2n$  gametes are a significant tool in the development of new breeding strategies. Indeed, the production of  $2n$  gametes has been used in potato and alfalfa to transmit useful traits from diploid wild relatives to tetraploid cultivated genotypes through crossing schemes based on sexual polyploidization.

While molecular and functional analysis of the genes disrupted in the mutants that produce  $2n$  gametes is a difficult task due to the polyploidy of the involved species, the diploid wild crucifer *Arabidopsis thaliana*, a model for higher plants, has been successfully used to identify genes involved in meiotic nuclear restitution resulting in  $2n$  gametes.

The purpose of this review is to describe two ma-

ior genes involved in  $2n$  gamete formation in *Arabidopsis thaliana*. The isolation of these genes is a milestone since it will surely help in the identification of candidate genes for  $2n$  gamete production in other plant species.

### Parallel Spindles 1 (AtPS1)

The product of normal microsporogenesis is a tetrahedron of haploid microspores following to a single round of DNA replication and two meiotic divisions. In potato, Mok and Peloquin<sup>2</sup> (1975), describing the cytological mechanism underlying the  $2n$  pollen production via FDR, showed that two parallel spindles occurred at second meiotic division instead of normally oriented spindles at 60°. This event leading to the formation of two groups of chromosomes moving to opposite poles resulted in a dyad of  $2n$  microspores. Based on genetic analysis, the authors suggested a single recessive mutation in a gene termed *Parallel Spindles* (PS).

The genomic complexity of *Solanum* species delayed functional studies on PS gene though its importance for potato breeding. More than thirty years elapsed before d'Erfurth and colleagues<sup>4</sup> provided

the first molecular analysis of unreduced pollen formation via FDR in *Arabidopsis* lines mutated in the gene *AtPS1*. The authors identified *AtPS1* gene using a bioinformatic tool on the basis of a good correlation with the expression pattern of known meiotic genes. Cytological analysis of *AtPS1* mutants showed that besides regular metaphase II-anaphase II spindles, parallel, fused or tripolar spindles mostly occurred explaining the appearance of unreduced dyads (69%) and tryads. Moreover, the analysis of *AtPS1* mutants in different ecotypes clearly showed that *AtPS1* acts as a major gene being the frequency of diploid gametes influenced by the genomic background. The *AtPS1* protein has two domains, a regulatory phosphopeptide recognition domain named ForkHead Associated domain (FHA), and a PINE domain, which is found in proteins involved in RNA processing. The authors suggest that *AtPS1* may directly control the orientation of metaphase spindles or be related to meiotic cell cycle control.

### Omission of second division (AtOSD)

The most common mechanism leading to  $2n$  eggs is the omission of the second meiotic division (os). In normal megasporogenesis, a linear array of four haploid megaspores is formed after the first and second divisions. When os is present there is no second division, and the homologous chromosomes just segregate and of the resulting two  $2n$  megaspores, one gives rise to the  $2n$  female gametophyte and the other degenerates. Omission of the second division is genetically equivalent to a SDR mechanism and is simply inherited as a Mendelian recessive trait<sup>5</sup>. It has been detected in a large number of *Solanum* species as well as in maize (*elongate* gene) but so far, analogously to *PS*, it is not cloned in a crop.

Using the same approach leading to the identification of *AtPS1*, d'Erfurth and colleagues<sup>6</sup> found in *Arabidopsis* the gene *Omission of Second Divi-*

*sion (OSD)*. *Atosd* mutants are fertile plants producing 100% and 85% of unreduced pollen and ovules, respectively. According to this observation, they found the progeny deriving from selfing to be tetraploid (4x) for the 84% and triploid (3x) for the 16% as a consequence of bilateral and unilateral sexual polyploidization. Cytological analysis showed a total absence of meiosis II leading to SDR  $2n$ -megaspores. OSD is a UVI4-like protein not containing conserved known functional domains. The authors suggest its involvement in regulation of the transition from meiosis I to meiosis II.

### Conclusions

The elegant work presented by d'Erfurth and colleagues<sup>6,5</sup> shed new light on the possible structure and function of *PS* and *OS* genes opening a breach toward the isolation and functional analysis of these genes in potato as well as in other important crops. Moreover, the strategy d'Erfurth and colleagues highlights the validity of using *Arabidopsis thaliana* as a model organism for complex processes such as unreduced gamete production. This will make it possible to synthesize new meiotic variants in crops species with economic and social benefits.

### References

1. Consiglio MP, Carputo D, Frusciante L, Monti L, Comella C. Meiotic mutations and crop improvement. In: Janick J, editor. *Plant Breeding Reviews*. 28. New Jersey: John Wiley & Sons; 2007. p.163-214.
2. Mok DWS, Pelosquin SJ. Three mechanisms of  $2n$  pollen formation in diploid potatoes. *Can J Genet Cytol* 1975; 17:217-25.
3. Werner JL, Pelosquin SJ. Occurrence and mechanisms of  $2n$  egg formation in  $2n$  potato. *Genome* 1991; 34: 975-82.
4. d'Erfurth I, Jolivet S, Proger N, Garrick O, Nowachikowa M, Simon M et al. Mutations in *AtPS1* (*Arabidopsis thaliana* Parallel Spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains. *PLoS Genet* 2008; 4(11): e1000274.
5. d'Erfurth I, Jolivet S, Proger N, Garrick O, Nowachikowa M, Mercier R. Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biol* 2009;7:e1000124.

# Histone hyperacetylation affects meiotic recombination and chromosome segregation in Arabidopsis

Giorgio Perrella<sup>1,†</sup>, M. Federica Consiglio<sup>1,†</sup>, Riccardo Aiese-Cigliano<sup>1</sup>, Gaetana Cremona<sup>1</sup>, Eugenio Sanchez-Moran<sup>2</sup>, Lucia Barra<sup>1</sup>, Angela Errico<sup>3</sup>, Ray A. Bressan<sup>4</sup>, F. Christopher H. Franklin<sup>2</sup> and Clara Conicella<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>CNR-IGV, Research Institute of Plant Genetics, Research Division, Portici, Via Università 133, 80055 Portici, Italy,

<sup>2</sup>School of Biosciences, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK,

<sup>3</sup>Department of Soil, Plant, Environmental and Animal Sciences, University of Naples 'Federico II', Via Università 100, 80055 Portici, Italy, and

<sup>4</sup>Department of Horticulture and Landscape Architecture, Purdue University, West Lafayette, IN, USA

Received 6 November 2009; revised 15 February 2010; accepted 17 February 2010; published online 8 April 2010.

\*For correspondence (fax +39 81 775 3579; e-mail conicell@unina.it).

†These authors contributed equally to this work.

## SUMMARY

In this study, the meiotic role of *MEIOTIC CONTROL OF CROSSOVERS1 (MCC1)*, a GCN5-related histone *N*-acetyltransferase, is described in *Arabidopsis*. Analysis of the over-expression mutant obtained by enhancer activation tagging revealed that acetylation of histone H3 increased in male prophase I. MCC1 appeared to be required in meiosis for normal chiasma number and distribution and for chromosome segregation. Overall, elevated MCC1 did not affect crossover number per cell, but has a differential effect on individual chromosomes elevating COs for chromosome 4, in which there is also a shift in chiasma distribution, and reducing COs for chromosome 1 and 2. For the latter there is a loss of the obligate CO/chiasma in 8% of the male meiocytes. The meiotic defects led to abortion in about half of the male and female gametes in the mutant. In wild type, the treatment with trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, phenocopies MCC1 over-expression in meiosis. Our results provide evidence that histone hyperacetylation has a significant impact on the plant meiosis.

**Keywords:** histone acetylation, meiosis, chromatin organization, chiasma, *Arabidopsis*.

## INTRODUCTION

Meiosis is a modified cell division programme essential to all the sexually reproducing eukaryotes. Starting with DNA replication and followed by two successive nuclear divisions, the major consequences of meiosis are a halving of chromosome number and the reassortment and segregation of genetic information guaranteed by homologous recombination (Zickler and Kleckner, 1998).

Histone modifications are increasingly recognized as playing important roles in meiotic recombination (Borde *et al.*, 2009; Buard *et al.*, 2009). In particular, histone acetylation was shown to be involved in meiotic recombination either by local analysis at hotspots in fission and budding yeast (Yamada *et al.*, 2004; Merker *et al.*, 2008) or by genome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* (Mieczkowski *et al.*, 2007). In fact, histones around the *ade6-M26* locus and *HIS4* locus, meiotic recombination hotspots in *Schizosaccharomyces pombe* and *S. cerevisiae* respectively, were highly acetylated during meiosis. Deletion of a

histone acetyltransferase (HAT), *SpGcn5*, required for *ade6-M26* hotspot-specific hyperacetylation, led to a partial decrease in DNA double-stranded breaks (DSBs) at this locus (Yamada *et al.*, 2004). Vice versa, loss-of-function of a histone deacetylase (HDAC), *ScRpd3p*, increases *HIS4* hotspot activity (Merker *et al.*, 2008). A mutation of the *SIR2* gene encoding a HDAC changes the genomic distribution of meiosis-specific DSBs in *S. cerevisiae*, elevating DSBs for 5% of yeast genes and reducing DSBs for 7% of the genes (Mieczkowski *et al.*, 2007). H3 and H4 acetylation enrichment was reported at the active mouse *Psmb9* hotspot. Interestingly, H3 acetylation was different in *Psmb9* and another hotspot, *Hlx1*, indicating distinct features between hotspots (Buard *et al.*, 2009). The function of histone acetylation might be direct in recruiting factors of meiotic recombination machinery and/or indirect by regulating chromatin structure at local and at higher-order levels (Hirota *et al.*, 2008). Indeed, histone acetylation has been demonstrated



*in vitro* to directly influence higher-order chromatin structure by inhibiting the formation of compact 30-nm chromatin fibres (Shogren-Knaak *et al.*, 2006). The observation that in budding yeast over 80% of histone H4 is acetylated at lysine 16 and most of the genome exists in a decondensed state is consistent with a role for histone acetylation in chromatin decompaction also *in vivo* (Lohr *et al.*, 1977; Smith *et al.*, 2003). In meiosis, a requirement for histone deacetylation in the condensation of metaphase chromosomes was reported in *Xenopus laevis* oocyte (Magnaghi-Jaulin and Jaulin, 2006). Histone acetylation can affect chromatin structure by altering the interactions of histones between adjacent nucleosomes or with the DNA (Kouzarides, 2007) and/or by collectively establishing a code recognized by downstream effector proteins and complexes (Strahl and Allis, 2000).

Histone deacetylation has been shown to be critical for chromosome segregation in TSA-treated mammalian oocytes. Indeed, histone hyperacetylation produced lagging chromosomes in mouse and pig (De La Fuente *et al.*, 2004; Akiyama *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006).

Studies on histone acetylation dynamics in plant meiosis are sketchy. To date, histone acetylation patterns have been described in Arabidopsis mutants, *ask1* (Yang *et al.*, 2006) and *dsy10* (Boateng *et al.*, 2008). Different loss-of-function mutations in genes for individual HATs/HDACs have been identified in *Arabidopsis thaliana* whose genome has 18 genes encoding potentially functional HDACs and 12 putative HAT genes (Pandey *et al.*, 2002; see also <http://www.chromdb.org>). Analyses of HDAC T-DNA knockout and antisense lines, which in most cases displayed histone hyperacetylation, revealed a role for the HDACs in reproductive development. In particular, down-regulation of *AtHD1*, which is a global regulator of different developmental processes, induced delayed flowering, flower abnormalities, partial sterility and consequent seed set dropping (Tian *et al.*, 2003). Silencing of *AtHD2A*, a plant-specific HDAC, severely disturbed reproductive development causing seed abortion (Wu *et al.*, 2000). An *AtHDA6* mutant was reported to exhibit reduced fertility, but only in the first flowers (Aufsatz *et al.*, 2002). However, *AtHDA6* is reported to be involved in the silencing of transgenes, DNA repeats, and rDNA loci (Probst *et al.*, 2004) as well in jasmonate response, senescence, and flowering (Wu *et al.*, 2008). Among HATs, *AtGCN5* (GNAT family), *AtHAG4/HAM1* and *HAG5/HAM2* (MYST family) have been functionally characterized in Arabidopsis. Mutation of *AtGCN5* induced many defects on plant development including sterility or partial fertility with production of few seeds (Bertrand *et al.*, 2003; Vlachonassios *et al.*, 2003). Loss-of-function of either *HAM1* or *HAM2* did not display any abnormal phenotype while no double mutant could be recovered. Analysis of *HAM1/ham1*; *ham2/ham2* and *ham1/ham1*; *HAM2/ham2* plants indicate that these MYST members are required for gametophyte

development (Latrasse *et al.*, 2008). In all the aforementioned mutants except the last, the mechanism underlying the reduction of plant fertility remained unclear and, in particular, meiosis was not directly investigated.

In this study we have used an over-expression mutant of a GCN5-related histone *N*-acetyltransferase gene, *MEIOTIC CONTROL OF CROSOVERS1 (MCC1)*, that was obtained by enhancer activation tagging (Perrella *et al.*, 2006) to investigate the interrelationship between histone hyperacetylation and meiotic events in Arabidopsis. Analysis of *mcc1* meiocytes revealed hyperacetylation of histone H3 during male meiosis that was accompanied by defects in chromosome segregation and changes in crossover number and distribution in different chromosomes.

## RESULTS

### Phenotype of the *mcc1* mutant

We isolated the *b16* line following T-DNA mutagenesis by enhancer activation tagging in a screen for mutants with low seed-set (Perrella *et al.*, 2006). The line exhibited a significant reduction in fertility, producing on average 68% fewer seeds per silique ( $n = 40$ ;  $P \leq 0.01$ ) than wild-type plants. Based on our subsequent cytological characterization, *b16* was re-named *meiotic control of crossovers1 (mcc1)*. Analysis of F1 plants from a wild type  $\times$  *mcc1* cross confirmed that the mutation is dominant.

During vegetative development the mutant showed some changes respect to wild type. The rosette leaves did appear narrower and elongated (Figure S1a). Additionally, *mcc1* plants exhibited faster stem elongation (Figure S1b) and flowered about 6 days earlier than wild type ( $P \leq 0.001$ ). Analysis of *mcc1* anthers revealed a strong reduction in pollen viability (Figure S1d). Inspection of *mcc1* siliques indicated failure of seed development (Figure S1e). On average *mcc1* siliques were 17% shorter than wild type (Figure S1f). Prior to the onset of female meiosis ovule development in *mcc1* resembled that in wild type. Histological examination of *mcc1* gynoeceia showed that following megasporogenesis the embryo sacs fail to differentiate in ~50% of *mcc1* ovules ( $n > 100$  ovules). Such that, at anthesis, the estimated number of fully developed ovules per gynoeceium was significantly less than in wild type ( $11.3 \pm 2.8$  versus  $22.6 \pm 4.8$ ;  $P \leq 0.005$ ) (Figure S2). However, the female lethality is not a gametophytic event because *MCC1* mutation inheritance was previously demonstrated to be sporophytic (Perrella *et al.*, 2006).

### Molecular characterization and expression of *MCC1*

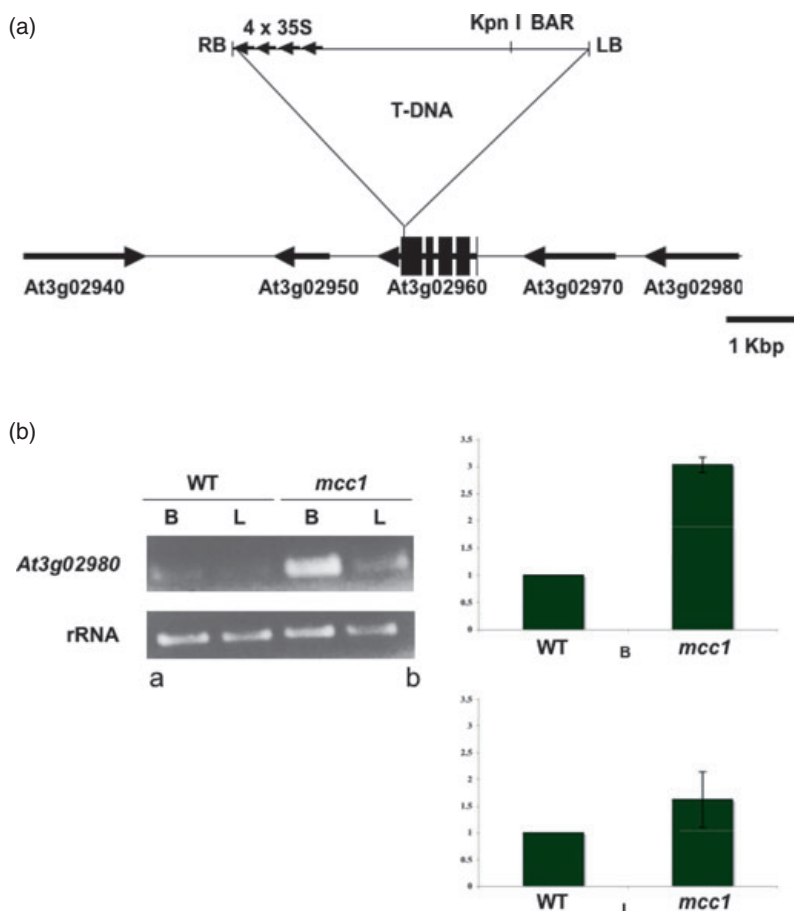
Previously, we showed that the *mcc1* mutation cosegregated with a single T-DNA associated herbicide-resistance marker demonstrating tight genetic linkage of the two loci (Perrella *et al.*, 2006). A DNA fragment flanking the T-DNA insert in *mcc1* plants was obtained by thermal asymmetric

interlaced-PCR (TAIL PCR) (Liu *et al.*, 1995). This sequence was found to match the last exon of the predicted Arabidopsis gene At3g02960. However, the insertion of the T-DNA into the coding sequence of At3g02960 (Figure 1a) provoked no gene deregulation (Figure S3) making unlikely that the low seed set phenotype could be associated with it. As the T-DNA included multiple copies of the CaMV 35S enhancer (Weigel *et al.*, 2000), we tested whether the insertion caused an enhancement of the expression of the adjacent genes (Figure S3). RT-PCR analysis, performed on leaves and flower buds, indicated that only the expression of gene At3g02980 (*MCC1*), located 9.6 kb from the CaMV 35S enhancers, was elevated in the mutant compared with wild type (Figure 1b). This finding was confirmed by quantitative real-time RT-PCR, which revealed that the transcript level of *MCC1* was higher in mutant flower buds and leaf tissue compared with wild type by a factor of 3- and 1.5-fold respectively (Figure 1b).

*MCC1* has five exons and four introns (Genebank accession AC018363; F13E7.7) and encodes a predicted 247 amino acid protein containing a GCN5-related *N*-acetyltransferase domain (GenBank accession no. NM\_111168). Our RT-PCR

experiments, loaded on 2% agarose gel, revealed two transcripts (Figure S4a). The smallest transcript (GenBank accession EU598462) contains the full predicted ORF while the longest (GenBank accession no. EU598461) retains 30 nt of the second intron that causes a premature termination codon truncating the coding sequence at the 97th amino acid (Figure S4b). We found one *MCC1* homologue (At5g16800, 78% identical) in the Arabidopsis genome using a BLASTP search using the predicted *MCC1* sequence as the query.

To confirm that the low seed set phenotype of *mcc1* was due to enhanced expression of *MCC1*, we generated transgenic Arabidopsis plants expressing a genomic DNA fragment of At3g02980 under the control of a CaMV 35S promoter. Ninety-nine transformants were obtained that on visual inspection were found to have a large variability in seed set/silique. Eight independent transgenic lines that displayed a strong reduction in seed set were analysed further. The presence of the transgene with CaMV 35S promoter and kanamycin marker was confirmed by PCR and cytological examination revealed a reduction in pollen viability and male meiotic abnormalities similar to those described below in *mcc1* (Figure S5). When the C24 ecotype



**Figure 1.** Chromosomal location of the T-DNA insertion and enhanced expression of the activated gene in *mcc1* mutant.

(a) Schematic representation of the T-DNA insertion site in the *mcc1* mutant. T-DNA is inserted within At3g02960 locus (exons are represented by black boxes), encoding a copper binding related protein. The four predicted genes, indicated by a black arrow, around T-DNA are At3g02950 encoding an unknown protein, *MYB107* (At3g02940) encoding a putative transcription factor, *EXL6* (At3g02970) encoding an exordium protein and At3g02980 encoding a GCN5-related *N*-acetyltransferase (GNAT) protein. BAR, Basta resistance. 4 × 35S denotes four copies of the 35S enhancer.

(b) Expression analyses of *MCC1*. (a) RT-PCR expression analysis of *MCC1* in wild type (WT) and *mcc1* bud (B) and leaf (L) tissue. The 18S RNA is the control for *MCC1* expression. (b) Real time RT-PCR of relative expression of *MCC1* in wild type (WT) and *mcc1* in reproductive (B, bud) and somatic (L, leaf) tissue. The actin (*ACT2*) gene is used as the normalization control. Values are mean ± SE (*n* = 3 experiments).

was transformed with the empty vector no effect on the phenotype was detected.

To perform loss-of-function of *MCC1*, T-DNA insertion lines SALK\_092359, SALK\_008970, and SALK\_135591 were analysed. The locus At3g02980 was tagged at the promoter (SALK\_092359, SALK\_008970) and at the third intron (SALK\_135591) (Figure S6a). Plants homozygous for the three independent mutant alleles had a phenotype resembling that of wild type. No difference in the expression level was seen for the *MCC1* gene between both lines SALK\_092359, and SALK\_008970 and the wild type with primers downstream of the insertion site (Figure S6b) revealing that *MCC1* is not disrupted in these two lines. In the case of line SALK\_135591, we failed to detect a transcript using primers spanning the insertion, although we detected a transcript using primers that were upstream of the insertion (Figure S6b). We hypothesized that either the truncated *MCC1* cDNA expressed in SALK\_135591 is functional or, alternatively, *MCC1* acts redundantly.

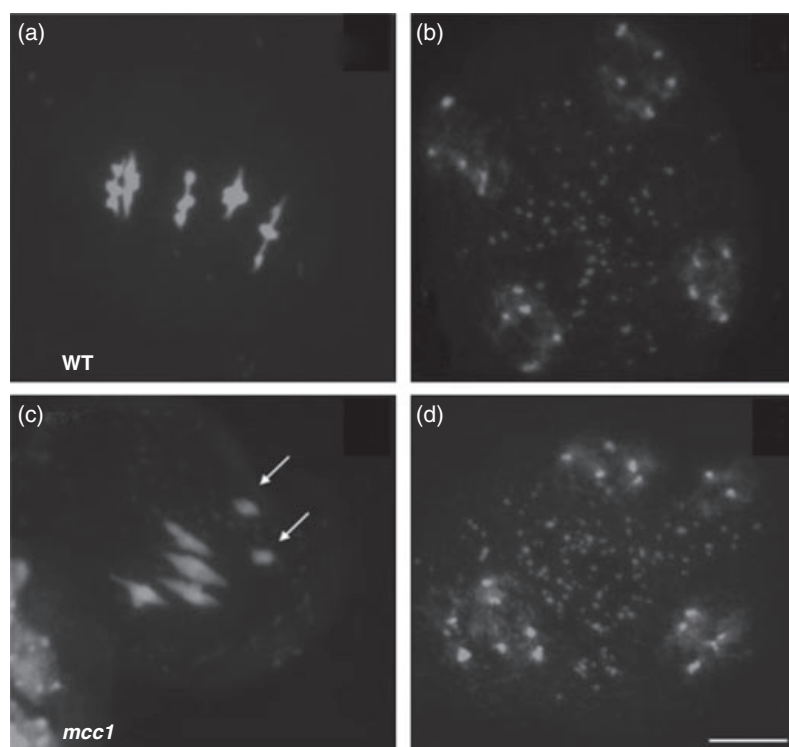
#### Occurrence of meiotic abnormality in *mcc1*

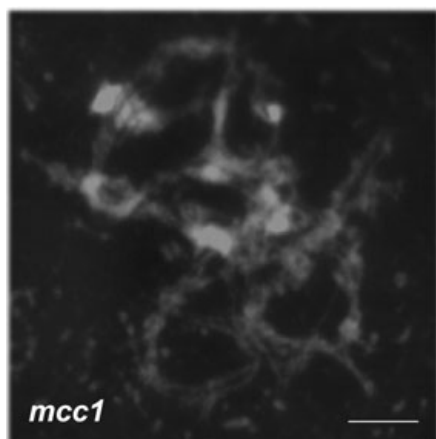
To investigate the basis of the reduced fertility phenotype in *mcc1* we conducted a cytological examination of meiosis using DAPI stained chromosome spread preparations from pollen mother cells (PMCs) at different meiotic stages (Figure 2). Earlier events of prophase I were not strikingly different from wild type PMCs isolated from anthers at a

comparable stage of development. At diplotene/diakinesis, the chromatin in *mcc1* was seemingly more relaxed in ~20% of the *mcc1* nuclei ( $n = 50$ ). The possibility that this might be indicative of a delay in prophase I progression was explored by conducting a time-course experiment using a 2-h pulse of bromo-deoxyuridine to label S-phase nuclei. Both *mcc1* and wild type took around 30 h to progress through prophase I. Although prophase I progression appeared not to be affected in *mcc1* the fate of those PMCs showing a strongly altered chromatin morphology is unclear (Figure 3). As the PMCs progressed beyond prophase I additional meiotic abnormalities became apparent. Inspection of chromosome spreads at metaphase I revealed the presence of univalent chromosomes in 8% of *mcc1* nuclei ( $n = 50$ ) (Figure 2c). Meiotic defects were also apparent at later meiotic stages. At anaphase I *mcc1* meiocytes showed lagging chromosomes (9%;  $n = 30$ ) and at telophase I uneven chromosome distribution was observed in 9% of PMCs ( $n = 50$ ) presumably due to the random segregation of the univalent chromosomes. Unsurprisingly, the defects were also observed in *mcc1* at the second meiotic division with missegregation at both anaphase II and telophase II (Figure 2d) and unequal sister chromatid distribution apparent in 21% of *mcc1* PMCs ( $n = 50$ ) giving rise to abnormal meiotic end products. However, that the frequency of these abnormalities was higher at meiosis II than meiosis I, cannot solely be explained by the univalent behaviour and is likely related

**Figure 2.** Microsporogenesis from wild-type (a, b) and *mcc1* (c, d) by DAPI staining in *Arabidopsis thaliana* ( $2n = 2x = 10$ ).

Metaphase I showing four bivalents plus two univalents (arrows) in *mcc1* (c), and five bivalents in wild-type (a). Telophase II showing unbalanced chromosome number in two nuclei in *mcc1* (d), and four balanced nuclei in wild type (b) as estimated by the count of chromosome-centres. Scale bar: 10  $\mu$ m.





**Figure 3.** Pollen mother cell (PMC) in *mcc1* at mid-prophase I showing a strongly altered morphology of the chromosomes. Scale bar: 2  $\mu$ m.

to aberrant centromere function in sister chromatid segregation.

Female meiosis was also investigated in *mcc1*. This study revealed univalents at metaphase I (Figure S7) and chromosome segregation defects similar to those observed in male meiosis.

#### **MCC1 over-expression changes chiasma number per chromosome and chiasma distribution**

To establish whether *MCC1* affected meiotic recombination, chiasma frequency and distribution were evaluated in male meiosis (Table 1) at metaphase I after FISH with 45S and 5S rDNA probes (Figure 4) that allow the five chromosome pairs to be individually recognized as previously described

by Sanchez-Moran *et al.* (2001). Interestingly, the univalent chromosomes that occurred in 8% of *mcc1* nuclei was apparently not random, as all FISH observations revealed that this only involved the nucleolar acrocentric chromosome 2 (Figure 4). This finding was not seen in corresponding wild type nuclei ( $n = 50$ ), which is in complete agreement with previous results indicating that the mechanism that imposes the formation of a minimum of a single obligate CO/chiasma in *Arabidopsis* is very robust. Rather surprisingly, given the observation of the univalents, the mean number of chiasmata per cell was 7.9 in both *mcc1* and wild type ( $n = 50$  PMCs). Analysis of bivalent configuration, that is, 'rod versus ring,' where the chiasmata are restricted to a single arm or present in both arms respectively, revealed a significant decrease of 'ring' bivalents in *mcc1* in respect to wild type for chromosome 1 ( $P = 0.037$ ) and a significant increase for chromosome 4 ( $P = 0.033$ ). No significant changes were apparent on the remaining chromosomes. Analysis of chiasma localization in terms of distal versus proximal revealed an apparent increase of proximal COs on short arm of chromosome 3, but the increase was not statistically significant ( $P = 0.094$ ). For chromosome 4 in *mcc1* a significant increase ( $P = 0.002$ ) in the proportion of distal versus proximal chiasmata, 43 versus 23 respectively, was observed relative to wild type (29 versus 32). This was accompanied by a significant increase ( $P = 0.041$ ) in the relative proportion of chiasmata in the short arm. As mentioned above, the effect of this was to increase the overall occurrence of ring bivalents by 12% relative to wild type. Overall, it appears that elevated *MCC1* did not affect cross-over number per cell, but has a differential effect on individual chromosomes elevating COs for chromosome 4, in which there is also a shift in chiasma distribution, and

Genotype	Configurations		Chiasmata			
	Bivalents, ring rod	Univalents	Distal	Proximal	Short arm	Long arm
<b>Wild type</b>						
chr1	0.92, 0.08	–	1.48	0.58	0.92	1.14
chr2	0.26, 0.74	–	0.78	0.48	0.34	0.92
chr3	0.54, 0.46	–	1.08	0.46	0.54	1.00
chr4	0.20, 0.80	–	0.58	0.64	0.24	0.98
chr5	0.78, 0.22	–	1.36	0.46	0.78	1.04
Total	2.70, 2.30	–	5.28	2.62	2.82	5.08
<b><i>mcc1</i></b>						
chr1	0.84 <sup>a</sup> , 0.16 <sup>a</sup>	–	1.40	0.52	0.84	1.08
chr2	0.22, 0.70	0.08	0.72	0.42	0.30	0.84
chr3	0.68, 0.32	–	1.10	0.62	0.68	1.04
chr4	0.32 <sup>a</sup> , 0.68 <sup>a</sup>	–	0.86 <sup>b</sup>	0.46 <sup>b</sup>	0.38 <sup>a</sup>	0.94
chr5	0.84, 0.16	–	1.44	0.42	0.84	1.02
Total	2.88, 2.02	0.08	5.52	2.44	3.04	4.92

Data was analysed by chi-squared test.

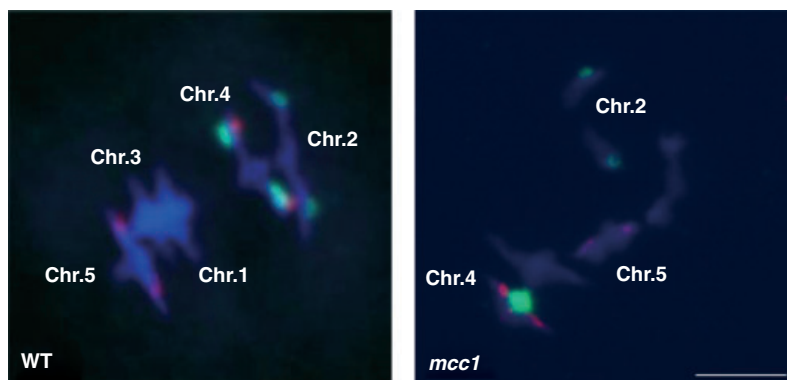
<sup>a</sup> $P \leq 0.05$ ; <sup>b</sup> $P \leq 0.01$ .

**Table 1** Average of pairing configurations per cell (rod versus ring), chiasmata per cell (distal versus proximal) and per bivalent arm (short versus long) in wild type and *mcc1* mutant ( $n = 50$  male meiocytes)



**Figure 4.** FISH from wild type (WT) and *mcc1* at metaphase I in male meiosis.

FISH was performed with the 5S rDNA (red) and 45S rDNA (green) probes. In WT, nucleolar chromosome 2 is a rod bivalent recognizable by 45S probes located on short arm; nucleolar chromosome 4 is a rod bivalent, as well, and shows 45S and 5S signals, both located on short arm. Chromosome 5 is a ring bivalent carrying only 5S. Chromosome 1 and 3 are ring bivalents without any signal and are distinguishable by size. In *mcc1*, the two univalents belong to chromosome 2 while chromosome 4 is configured as a ring bivalent. Scale bar: 5  $\mu$ m.



reducing COs for chromosome 1 and 2. In the latter this leads to the loss of the obligate CO/chiasma in some nuclei.

#### Synaptonemal complex (SC) appears normal in *mcc1*

Based on our observation that recombination was affected in *mcc1* we investigated whether SC was normal in the mutant. Immunolocalization studies were carried out on spread preparation of PMCs from the mutant at various stages throughout prophase I using Abs recognizing the axis-associated protein, ASY1 (Armstrong *et al.*, 2002) and the SC transverse element protein, ZYP1 (Higgins *et al.*, 2005). In wild type, immunolocalization of ASY1 indicates that the protein associates with the chromatin in G2 as numerous punctate foci. At the onset of leptotene there is a rapid, co-ordinated change in the distribution to a linear chromosome axis associated signal (Sanchez-Moran *et al.*, 2007). This finding coincides with the elaboration of the chromosome axes (Figures S8 and S9). In *mcc1* initial localization of ASY1 is indistinguishable from that in wild type (Figure S10a–c), but subsequently the axis transition appeared less coordinated (Figure S10d–i). This situation was manifested in the presence of nuclei at zygotene that exhibited stretches of linear ASY1 signal set against a diffuse chromatin-associated signal (Figure S10g–i). We have never observed this distribution of ASY1 in wild type material (Figure S9d–i). As prophase I progressed through zygotene to pachytene the ASY1 assumed a more typical linear signal running the length of the chromosome axes and there appears no substantive effect on the rate of progression of the PMCs through to pachytene (Figure S10j–l). At pachytene, ASY1 behaviour was accompanied by apparently normal SC formation based on immunolocalization of ZYP1 (Figure S11).

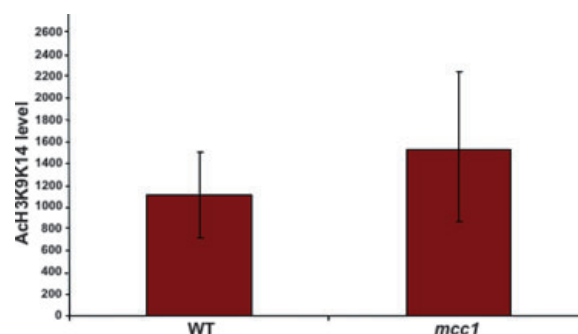
#### Hyperacetylation of histone H3 in *mcc1* male meiosis

Based on our findings that meiosis was defective in the mutant we surmised that if the prediction that MCC1 possesses histone acetyltransferase activity was correct, then evidence of histone hyperacetylation should be apparent in

*mcc1* PMCs. The level of histone acetylation in *mcc1* and wild type PMC spread preparations was quantified at pachytene by measuring the fluorescence signal intensity following dual-immunolocalization using an antibody (Ab) recognizing the lysine residues K9 and K14 on the tail of histone H3 (H3K9K14Ac) (Figure 5) and an anti-ASY1 Ab or, alternatively, anti-ZYP1 Ab (Figure S8). ASY1 and ZYP1 being well characterized for their spatial and temporal distribution during prophase I allow to identify unambiguously the PMC stage. The fluorescence signal arising from the anti-H3K9K14Ac Ab was consistently stronger in *mcc1* by a factor of 30% ( $n = 85$  nuclei) (Figure 5). This finding is consistent with *mcc1* PMCs exhibiting an elevated level of histone H3 acetylation.

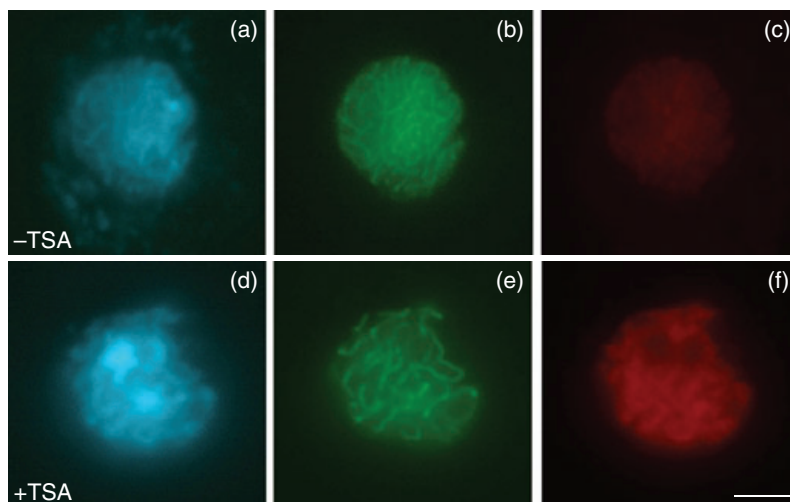
#### Trichostatin A treatment phenocopies MCC1 over-expression

To obtain additional evidence that the meiotic defects described in *mcc1* were induced by the histone hyperacetylation, we treated wild type plants with trichostatin A (TSA), an inhibitor of histone deacetylases (Murphy *et al.*, 2000). Immunolocalization with anti-H3K9K14Ac Ab confirmed that the PMCs from the treated plants exhibited hyperacetylation



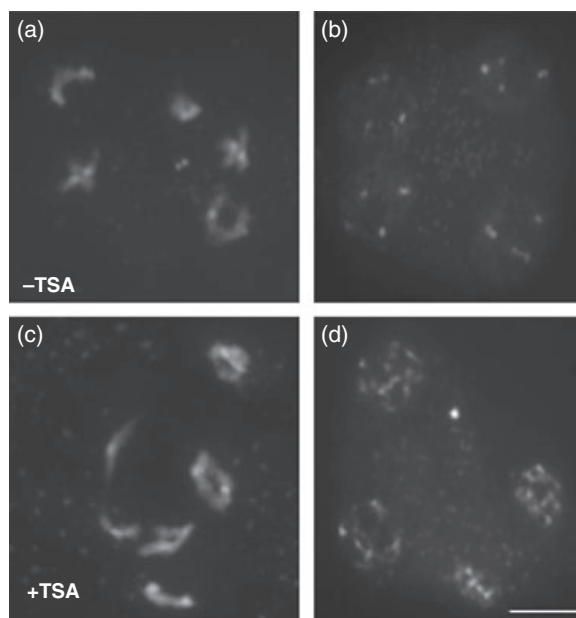
**Figure 5.** Level of histone acetylation in wild type and *mcc1* microsporocytes at pachytene ( $n = 85$  nuclei).

It was measured by fluorescence intensity according to 'Step by Step AnalySIS' software. Data are means and SD.



**Figure 6.** Dual immunolocalization of ASY1 (green; b, e), and H3K9K14Ac (red; c, f) to PMCs at zygonema with trichostatin A-treatment (+TSA, d–f) and without (–TSA, a–c). DNA was counterstained with DAPI (a, d). Higher level of histone acetylation is shown in TSA-treated sample (f) respect to untreated (c) at the same stage when ASY1 is visible as a continuous signal along chromosome axes (b, e). Scale bar: 5  $\mu$ m.

(Figure 6) indicating that deacetylation was inhibited starting at the lowest TSA concentration (10 ng/ml). The observation of DAPI-stained chromosome spreads in PMCs revealed that TSA treatment was able to phenocopy the meiotic defects of *mcc1* mutant. This factor included the presence of univalents at diakinesis (Figure 7c) leading to missegregation and unbalanced nuclei at the end of meiosis



**Figure 7.** Meiosis from representative PMCs of wild type after the treatment with histone deacetylase inhibitor trichostatin A (+TSA, c, d) as compared with untreated PMCs (–TSA, a, b). In TSA-treated PMCs (10 ng/ml TSA), 2 univalents at diakinesis (c), and unbalanced nuclei at telophase II (d). Regular behaviour is shown by untreated PMCs (a, b). Scale bar: 10  $\mu$ m.

(Figure 7d). No meiotic irregularities were detected in untreated plants (Figure 7a,b). Thus, these results indicate that the effect of TSA treatment during meiosis is substantially the same as over-expression of *MCC1*.

## DISCUSSION

Our analysis of the *A. thaliana mcc1* mutant where enhanced activation of a putative histone acetylase results in hyperacetylation of histone H3 in male meiosis has revealed compelling evidence of a link between histone de/acetylation and normal meiotic progression.

In *mcc1*, hyperacetylation has a clear effect on chiasma behaviour although not univocal for all the chromosomes. In particular, chromosome 1 shows a tendency ( $P < 0.05$ ) to form a single CO per bivalent instead of double COs typical of wild-type. CO assurance on chromosome 2 is defective, such that a proportion (8%) fails to form the obligate CO which is the minimum requirement to ensure accurate chromosome segregation at the first meiotic division (Lam *et al.*, 2005). Chromosome 4 formed a significantly greater proportion ( $P < 0.05$ ) of double COs per bivalent compared with wild type. Indeed, in this chromosome we observed a significant increase ( $P < 0.05$ ) in the proportion of chiasmata in the short arm (s.a.) relative to the long arm (l.a.) in *mcc1* (0.38 s.a./0.94 l.a.) compared with wild type (0.24 s.a./0.94 l.a.). CO increase was accompanied by a significant shift ( $P < 0.01$ ) toward distal chiasmata in the long arm of the chromosome 4. We propose that different chromosome features may underlie the differential response to hyperacetylation observed for chromosome 4 in *mcc1*. Apart from its smaller size, which may well be relevant, the key feature of chromosome 4 is the presence of a large array of rDNA in the short arm (Copenhaver and Pikaard, 1996). Additionally, a cluster of CO hotspots has been mapped to the short arm of chromosome 4 adjacent to the

heterochromatic NOR (Drouaud *et al.*, 2006). It is therefore conceivable that hyperacetylation might enhance the activity of the pre-existing hotspot cluster on the short arm of chromosome 4 or, alternatively, induce novel recombination sites possibly located at NOR or flanking regions. Several previous studies lend support to this hypothesis. It is well documented that hyperacetylation of histone H3 or H4 occurs in recombinationally active chromosomal domains such as chicken immunoglobulin locus (Seo *et al.*, 2005), fission yeast *ade6-M26* (M26) locus (Yamada *et al.*, 2004), and mouse hotspot *Psmb9* (Buard *et al.*, 2009). Furthermore, mutation in the budding yeast histone deacetylase *RPD3* stimulates meiotic recombination at *HIS4* hotspot locus as measured through the double-stranded DNA breaks (DSBs), which are the earliest determinants of crossovers (Merkner *et al.*, 2008). In contrast, histone hypoacetylation characterizes recombination-suppressed regions at rRNA gene clusters as well as at telomeres in budding yeast (Millar and Grunstein, 2006). When the histone deacetylase *SIR2* gene is deleted, an elevated rate of intrachromosomal recombination is observed in the rRNA genes (Gottlieb and Esposito, 1989). Consistent with this observation, the frequency of DSBs increases in rDNA and flanking regions in the *sir2* mutant (Mieczkowski *et al.*, 2007). Finally a study in *A. thaliana* showed that mutation of the histone deacetylase *HDA6* resulted in a loss of transcriptional silencing of repetitive sequences, chromatin decondensation and significant hyperacetylation localized to the NOR (Probst *et al.*, 2004). Although whether this had an effect during meiosis was not explored. That chromosome 2 behaves differently to chromosome 4 despite structural similarities, in terms of size and rDNA array, cannot readily be addressed at present. It is of interest that differences in the behaviour of the two chromosomes have previously been noted (Santos *et al.*, 2003). We assume that CO failure occurring on chromosome 2 as well as on chromosome 1 may be related to the number and relative distribution of CO hotspots along these chromosomes. However the distribution of hotspots on chromosome 1 and 2 has not yet been reported. Modifications in CO number and distribution could be related to changes in chromatin structure imposed by hyperacetylation. Indeed, over-expression of *MCC1* seems to have an effect on meiotic chromosome condensation that needs to be deeply investigated. In other organisms, hyperacetylation due to pharmacological inhibition of HDACs hampers the chromosome condensation during meiosis (Akiyama *et al.*, 2006; De La Fuente, 2006; Magnaghi-Jaulin and Jaulin, 2006; Wang *et al.*, 2006; Bui *et al.*, 2007), whereas over-expression of a deacetylase causes a premature chromatin condensation (Verdel *et al.*, 2003). In addition, the observation that *ASY1* behaviour appears abnormal would suggest that overexpression of *MCC1* affects chromatin organization since early meiosis.

Our analysis of *mcc1* evidences that histone de/acetylation is critical for ensuring the proper chromosome/sister chromatid segregation. Furthermore, this is supported by the observations of TSA-treated wild type meiocytes. A general requirement of histone deacetylation for proper segregation is illustrated in other organisms, in mitotic as well as in meiotic cells. For instance, hyperacetylation following treatment with histone deacetylase inhibitors results in chromosome segregation defects in fission yeast (Ekwall *et al.*, 1997), human (Cimini *et al.*, 2003) and tobacco (Li *et al.*, 2005) mitotic cells, as well as in mouse (De La Fuente *et al.*, 2004; Akiyama *et al.*, 2006) and porcine (Wang *et al.*, 2006) female meiosis. Evidence has been provided for the role of histone deacetylation in epigenetic control of centromeric heterochromatin (Ekwall *et al.*, 1997; Taddei *et al.*, 2001; Cimini *et al.*, 2003; De La Fuente *et al.*, 2004), in centromere cohesion (Eot-Houllier *et al.*, 2008) and kinetochore-microtubule attachment (Ishii *et al.*, 2008).

In *mcc1*, meiotic histone hyperacetylation influences negatively plant fertility by acting on male and female meiosis. In yeast, mutations in HATs produced meiotic arrest (Burgess *et al.*, 1999; Choy *et al.*, 2001), whereas TSA-dependent hyperacetylation caused apoptosis in murine male meiosis (Fenic *et al.*, 2004), and aneuploidy in female meiosis (Akiyama *et al.*, 2006) or inhibited the progression of meiotic maturation in half of the oocytes (De La Fuente *et al.*, 2004).

In conclusion, our findings point out that *MCC1* has a role in meiosis by influencing recombination and chromosome segregation. In a context of histone code hypothesis (Strahl and Allis, 2000; Jenuwein and Allis, 2001), it is likely that hyperacetylation driven by *MCC1* may alter the pattern of other histone modifications, methylation, phosphorylation and ubiquitination, especially at level of specialized sub-chromosomal domains.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Plant material and growth conditions

The Arabidopsis *mcc1* mutant was previously isolated from an enhancer activation tagging population (Perrella *et al.*, 2006) obtained after *Agrobacterium tumefaciens* floral transformation with strain GV3101 carrying the binary vector pSKI015 (Koiwa *et al.*, 2002). C24 line homozygous for the chimeric *RD29A:LUC* reporter gene (Ishitani *et al.*, 1997) is the background of tagged T-DNA population and was used in this study as wild type. Plants were grown both in a controlled growth room with 16 h/8 h of light/dark at 22°C/18°C and in greenhouse. Phenotypic analysis was performed according to Boyes *et al.* (2001). Plant material was collected as described by Higgins *et al.* (2004).

### Nucleic acid extraction

Plant genomic DNA was isolated using the DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Bacterial plasmid DNA was isolated using QIAprep® Spin Miniprep Kit (QIAGEN, <http://www1.qiagen.com>). Total RNA from wild type and *mcc1* leaves and prebolting buds was extracted using the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) and then treated with DNase I

(Invitrogen, <http://www.invitrogen.com>) to remove residual genomic DNA.

### Identification of T-DNA tagged locus

Genomic sequence flanking the T-DNA insertion in *mcc1* was determined by using the TAIL-PCR procedure of Liu *et al.* (1995) with primers corresponding to the nested regions internal to the left border and degenerated primers as listed in Table S1 online.

### Identification of T-DNA insertion mutants

T-DNA insertion lines SALK\_092359, SALK\_008970, and SALK\_135591 were obtained from the ABRC and screened for homozygous progeny as described using specific primers and T-DNA primer suggested (Alonso *et al.*, 2003).

### RT-PCR analysis

The SuperScript™ One-Step RT-PCR with Platinum *Taq* kit (Invitrogen) was used to amplify gene-specific products from total RNA. Primers designed to amplify the genes flanking the insertion site and 18S rRNA, used to equalize the RNA loading into RT-PCR reaction, are listed in Table S1 online.

### Real-time RT-PCR analysis

The SuperScript III reverse transcriptase (Invitrogen) was used to synthesize first-strand cDNA from total RNA. Gene-specific primers were designed using PRIMER EXPRESS software, ver. 2.0 (Applied Biosystems®), <http://www3.appliedbiosystems.com> and are listed in Table S1 online. Real-time PCR analysis was performed using the ABI PRISM 7000 instrument (Applied Biosystems®) and SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem). Data were analysed through 7000 System SDS software ver. 1.2.3 (Applied Biosystems®). The amplification plots were analysed automatically calculating the baseline and the Ct values. Actin was used as endogenous control. Relative expression data were obtained by comparing wild type versus *mcc1* mutant samples.

### MCC1 cloning and nucleic acid sequencing

The coding region of *MCC1* was amplified by RT-PCR by using SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) with an oligo-dT (12–18) in C24 ecotype. The cDNA was subjected to PCR with gene-specific primers as listed in Table S1 online and cloned into PCR2.1 (Invitrogen). *MCC1* genomic fragment (corresponding to the region 14096–15414 of BAC clone F13E7) was amplified from C24 DNA by PCR with primers listed in Table S1 online and cloned into the binary vector pKYLX7135S<sup>2</sup> (Schardl *et al.*, 1987) to generate pKYLX7135S<sup>2</sup>–*MCC1*. Nucleotide sequencing was carried out by Eurofins MWG Operon sequencing service (Germany).

### Recapitulation analysis

The construct pKYLX7135S<sup>2</sup>–*MCC1* was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101, which was used to transform C24 ecotype as described by Koiwa *et al.* (2002). The seed set/silique, the pollen viability, and the microsporogenesis were observed on T<sub>1</sub> transgenic plants harboring the overexpression construct to reconfirm the *MCC1* gene function.

### Cytohistological analysis

Male meiosis was examined by light microscopy in 4′-6-diamidino-2 phenylindole (DAPI)-stained pollen mother cells (PMCs) as described by Ross *et al.* (1996). Female meiosis observation was performed according to Armstrong and Jones (2001). Chiasmata

were recorded at metaphase I in PMCs after fluorescence *in situ* hybridization (FISH) following the method of Sanchez-Moran *et al.* (2001). Fluorescence immunolocalization was carried out on chromosome spreadings in PMCs at prophase I as described by Armstrong *et al.* (2002). The following antibodies have been used: anti-ASY1 (rat, dilution 1:500), anti-ZYP1 (rabbit/rat, dilution 1:500), and anti-H3K9K14Ac (Upstate Biotechnology, catalogue no. 06–599; rabbit, dilution 1:500) (Armstrong *et al.*, 2002; Sanchez-Moran *et al.*, 2007). Slides were analyzed by fluorescence microscopy using a Nikon Eclipse T300 microscope. Image acquisition and analysis were conducted using ‘Step by Step Analysis’ software (Soft Imaging System GmbH, <http://www.soft-imaging.net>). The intensity of fluorescence was quantified by measuring the pixel value of fluorescence within a defined Region of Interest (ROI) using a 12-bit CCD camera.

Pollen viability was assessed by Alexander’s staining (Alexander, 1969). For gynoecia observation, DAPI-stained longitudinal sections (8 µm) of buds collected at the floral stages 10–13, as defined by Smyth *et al.* (1990), corresponding to ovule stages 2–3 (Schneitz *et al.*, 1995), were performed according to paraffin-embedding procedure (Sharma and Sharma, 1980).

### Bromodeoxyuridine (BrdU) pulse-labelling treatment

BrdU pulses were performed and detected using an anti-BrdU kit (Roche, <http://www.roche.com>) according to the technique described by Armstrong *et al.* (2003).

### Trichostatin A treatment

The inflorescence stems from wild type and *mcc1* mutant were cut under water and placed in different concentrations of trichostatin A (Roche) (10, 100, 1000 ng/ml) as previously described for aminopeptidase inhibitor assay (Sanchez-Moran *et al.*, 2004). After 39 h the floral buds were fixed and PMCs analyzed as above reported.

### Accession numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL databases under the following accession numbers: *MCC1*, At3g02980; EXP6, At3g02970; EST, At3g02950; MYB107, At3g02940; COBP, At3g02960; Actin, At3g18780; 18SrRNA, At3g41768.

### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr Maria Luisa Chiusano for helpful suggestions in bioinformatics. Valuable technical support was provided by Rosa Maisto, Elvira Lotti and Antonio Scafarto. We thank the ABRC for providing Arabidopsis seeds of the T-DNA insertion lines. This work was supported by the Italian Ministry of Research. Prof. FCH Franklin and Dr Eugenio Sanchez-Moran were funded by BBSRC. Contribution no. 345 from CNR-IGV, Research Institute of Plant Genetics, Research Division: Portici, Italy.

### SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Figure S1.** Vegetative development and reproductive organs in *mcc1* mutant and wild type (WT).

**Figure S2.** Histological sections of gynoecia from *mcc1* and wild type.

**Figure S3.** RT-PCR analysis of genes surrounding the T-DNA insertion site in *mcc1*.

**Figure S4.** Different *MCC1* mRNA variants.

**Figure S5.** Microsporogenesis in 35S::*MCC1* plants.



**Figure S6.** Schematic representation of *MCC1* locus showing the T-DNA insertion sites in SALK lines.

**Figure S7.** Female meiosis from wild-type and *mcc1*.

**Figure S8.** Dual immunolocalization of ASY1 or ZYP1 and H3K9K14Ac to PMCs in *mcc1* and wild type.

**Figure S9.** Immunolocalization of ASY1 protein to early and mid-prophase I nuclei of wild type.

**Figure S10.** Immunolocalization of ASY1 protein to early and mid-prophase I nuclei of *mcc1* mutant.

**Figure S11.** Dual immunolocalization of ASY1 and ZYP1 to male mid-prophase I nuclei of wild type and *mcc1*.

**Table S1** Oligonucleotides used in this study.

Please note: As a service to our authors and readers, this journal provides supporting information supplied by the authors. Such materials are peer-reviewed and may be re-organized for online delivery, but are not copy-edited or typeset. Technical support issues arising from supporting information (other than missing files) should be addressed to the authors.

## REFERENCES

- Akiyama, T., Nagata, M. and Aoki, F. (2006) Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 7339–7344.
- Alexander, M.P. (1969) Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* **44**, 117–122.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J. *et al.* (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653–657.
- Armstrong, S.J. and Jones, G.H. (2001) Female meiosis in wild type *Arabidopsis thaliana* and in two meiotic mutants. *Sex. Plant Reprod.* **13**, 177–183.
- Armstrong, S.J., Caryl, A.P., Jones, G.H. and Franklin, F.C.H. (2002) Asy1, a protein required for meiotic chromosome synapsis, localizes to axis-associated chromatin in *Arabidopsis* and *Brassica*. *J. Cell Sci.* **115**, 3645–3655.
- Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. (2003) A meiotic time-course for *Arabidopsis thaliana*. *Sex. Plant Reprod.* **16**, 141–149.
- Aufsatz, W., Mette, M.F., Van Der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A.J. (2002) HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *EMBO J.* **21**, 6832–6841.
- Bertrand, C., Bergounioux, C., Domenichini, S., Delarue, M. and Zhou, D.X. (2003) *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 28246–28251.
- Boateng, K.A., Yang, X., Dong, F., Owen, H.A. and Makaroff, C.A. (2008) SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. *Mol. Plant*, **1**, 620–633.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Géli, B. and Nicolas, A. (2009) Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *EMBO J.* **28**, 99–111.
- Boyes, D.C., Zaved, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R. and Görlach, J. (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell*, **13**, 1499–1510.
- Buard, J., Barthès, P., Grey, C. and de Massy, B. (2009) Distinct histone modifications define initiation and repair of meiotic recombination in the mouse. *EMBO J.* **28**, 2616–2624.
- Bui, H.T., Van Thuan, N., Kishigami, S., Wakayama, S., Hikichi, T., Ohta, H., Mizutani, E., Yamaoka, E., Wakayama, T. and Miyano, T. (2007) Regulation of chromatin and chromosome morphology by histone H3 modifications in pig oocytes. *Reproduction*, **133**, 371–382.
- Burgess, S.M., Ajimura, M. and Kleckner, N. (1999) GCN5-dependent histone H3 acetylation and RPD3-dependent histone H4 deacetylation have distinct, opposing effects on IME2 transcription, during meiosis and during vegetative growth, in budding yeast. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 6835–6840.
- Choy, J.S., Tobe, B.T., Huh, J.H. and Kron, S.J. (2001) Yng2p-dependent NuA4 histone H4 acetylation activity is required for mitotic and meiotic progression. *J. Biol. Chem.* **276**, 43653–43662.
- Cimini, D., Mattiuzzo, M., Torosantucci, L. and Degrossi, F. (2003) Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3821–3833.
- Copenhaver, G.P. and Pikaard, C.S. (1996) RFLP and physical mapping with an rDNA-specific endonuclease reveals that nucleolus organizer regions of *Arabidopsis thaliana* adjoin the telomeres on chromosomes 2 and 4. *Plant J.* **9**, 259–272.
- De La Fuente, R. (2006) Chromatin modifications in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes. *Dev. Biol.* **292**, 1–12.
- De La Fuente, R., Viveiros, M.M., Burns, K.H., Adashi, E.Y., Matzuk, M.M. and Eppig, J.J. (2004) Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev. Biol.* **275**, 447–458.
- Drouaud, J., Camilleri, C., Bourguignon, P.Y. *et al.* (2006) Variation in crossing-over rates across chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana* reveals the presence of meiotic recombination 'hot spots'. *Genome Res.* **16**, 106–114.
- Ekwall, K., Olsson, T., Turner, B.M., Cranston, G. and Allshire, R.C. (1997) Transient inhibition of histone deacetylation alters the structural and functional imprint at fission yeast centromeres. *Cell*, **91**, 1021–1032.
- Eot-Houllier, G., Fulcrand, G., Watanabe, Y., Magnaghi-Jaulin, L. and Jaulin, C. (2008) Histone deacetylase 3 is required for centromeric H3K4 deacetylation and sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* **22**, 2693–2744.
- Fenic, I., Sonnack, V., Failing, K., Bergmann, M. and Steger, K. (2004) In vivo effects of histone-deacetylase inhibitor trichostatin-A on murine spermatogenesis. *J. Androl.* **25**, 811–818.
- Gottlieb, S. and Esposito, R.E. (1989) A new role for a yeast transcriptional silencer gene, SIR2, in regulation of recombination in ribosomal DNA. *Cell*, **56**, 771–776.
- Higgins, J.D., Armstrong, S.J., Franklin, F.C. and Jones, G.H. (2004) The *Arabidopsis* MutS homolog AtMSH4 functions at an early step in recombination: evidence for two classes of recombination in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **18**, 2557–2570.
- Higgins, J.D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Jones, G.H. and Franklin, F.C. (2005) The *Arabidopsis* synaptonemal complex protein ZYP1 is required for chromosome synapsis and normal fidelity of crossing over. *Genes Dev.* **15**, 2488–2500.
- Hirota, K., Mizuno, K., Shibata, T. and Ohta, K. (2008) Distinct chromatin modulators regulate the formation of accessible and repressive chromatin at the fission yeast recombination hotspot *ade6-M26*. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 1162–1173.
- Ishii, S., Kurasawa, Y., Wong, J. and Yu-Lee, L.Y. (2008) Histone deacetylase 3 localizes to the mitotic spindle and is required for kinetochore-microtubule attachment. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 4179–4184.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B. and Zhu, J.K. (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, **9**, 1935–1949.
- Jenuwein, T. and Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074–1080.
- Koike, H., Barb, A.W., Xiong, L. *et al.* (2002) C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signaling, growth, and development. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 10893–10898.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693–705.
- Lam, S.Y., Horn, S.R., Radford, S.J., Housworth, E.A., Stahl, F.W. and Copenhaver, G.P. (2005) Crossover interference on nucleolus organizing region-bearing chromosomes in *Arabidopsis*. *Genetics*, **170**, 807–812.
- Latrasse, D., Benhamed, M., Henry, Y., Domenichini, S., Kim, W., Zhou, D.X. and Delarue, M. (2008) The MYST histone acetyltransferases are essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol.* **8**, 121.
- Li, Y., Butenko, Y. and Grafi, G. (2005) Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells. *Plant J.* **41**, 346–352.
- Liu, Y., Mitsukawa, N., Oosumi, T. and Whitter, R.F. (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J.* **8**, 457–463.
- Lohr, D., Kovacic, R.T. and Van Holde, K.E. (1977) Quantitative analysis of the digestion of yeast chromatin by staphylococcal nuclease. *Biochemistry*, **16**, 463–471.
- Magnaghi-Jaulin, L. and Jaulin, C. (2006) Histone deacetylase activity is necessary for chromosome condensation during meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *Chromosome Res.* **14**, 319–332.

- Merker, J.D., Dominska, M., Greewell, P.W., Rinella, E., Bouck, D.C., Shibata, Y., Strahl, B.D., Mieczkowski, P. and Petes, T.D. (2008) The histone methylase Set2p and the histone deacetylase Rpd3p repress meiotic recombination at the HIS4 meiotic recombination hotspot in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair*, **7**, 1298–1308.
- Mieczkowski, P.A., Dominska, M., Buck, M.J., Lieb, J.D. and Petes, T.D. (2007) Loss of a histone deacetylase dramatically alters the genomic distribution of Spo11p-catalyzed DNA breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **104**, 3955–3960.
- Millar, C.B. and Grunstein, M. (2006) Genome-wide patterns of histone modifications in yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 657–666.
- Murphy, J.P., McAleer, J.P., Ugliarolo, A., Papile, J., Weniger, J., Bethelmie, F. and Tramontano, W.A. (2000) Histone deacetylase inhibitors and cell proliferation in pea root meristems. *Phytochemistry*, **55**, 11–18.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W. and Jorgensen, R.A. (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5036–5055.
- Perrella, G., Cremona, G., Consiglio, F., Errico, A., Bressan, R.A. and Conicella, C. (2006) Screening for mutations affecting sexual reproduction after activation tagging in *Arabidopsis thaliana*. *J. Appl. Genet.* **47**, 109–111.
- Probst, A.V., Fagard, M., Proux, F. et al. (2004) *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 is required for maintenance of transcriptional gene silencing and determines nuclear organization of rDNA repeats. *Plant Cell*, **16**, 1021–1034.
- Ross, K.J., Frasz, P. and Jones, G.H. (1996) A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* **4**, 507–516.
- Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Santos, J.L., Franklin, C.H. and Jones, G.H. (2001) Chiasma formation in *Arabidopsis thaliana* accession Wasileskija and in two meiotic mutants. *Chromosome Res.* **9**, 121–128.
- Sanchez-Moran, E., Jones, G.H., Franklin, C.H. and Santos, J.L. (2004) A puromycin-sensitive aminopeptidase is essential for meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **16**, 2895–2909.
- Sanchez-Moran, E., Santos, J.L., Jones, G.H. and Franklin, C.H. (2007) ASY1 mediates AtDMC1-dependent interhomolog recombination during meiosis in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **21**, 2220–2233.
- Santos, J.L., Alfaro, D., Sanchez-Moran, E., Armstrong, S.J., Franklin, F.C.H. and Jones, G.H. (2003) Partial diploidization of meiosis in autotetraploid *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, **165**, 1533–1540.
- Schardl, C.L., Bvrd, A.D., Benzon, G., Altschuler, M.A., Hildebrand, D.F. and Hunt, A.G. (1987) Design and construction of a versatile system for the expression of foreign genes in plants. *Gene*, **61**, 1–11.
- Schneitz, K., Hülskamp, M. and Pruitt, R.E. (1995) Wild type ovule development in *Arabidopsis thaliana* – a light microscope study of cleared whole-mount tissue. *Plant J.* **7**, 731–749.
- Seo, H., Masuoka, M., Murofushi, H., Takeda, S., Shibata, T. and Ohta, K. (2005) Rapid generation of specific antibodies by enhanced homologous recombination. *Nat. Biotechnol.* **23**, 731–735.
- Sharma, A.K. and Sharma, A. (1980) Processing. In *Chromosome Techniques*. London: Butterworths and Co., pp. 71–90.
- Shogren-Knaak, M., Ishii, H., Sun, J.M., Pazin, M.J., Davie, J.R. and Peterson, C.L. (2006) Histone H4–K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science*, **311**, 844–847.
- Smith, C.M., Gafken, P.R., Zhang, Z., Gottschling, D.E., Smith, J.B. and Smith, D.L. (2003) Mass spectrometric quantification of acetylation at specific lysines within the amino-terminal tail of histone H4. *Anal. Biochem.* **316**, 23–33.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L. and Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **8**, 755–767.
- Strahl, B.D. and Allis, C.D. (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature*, **403**, 41–45.
- Taddei, A., Maison, C., Roche, D. and Almouzni, G. (2001) Reversible disruption of pericentric heterochromatin and centromere function by inhibiting deacetylases. *Nat. Cell Biol.* **3**, 114–120.
- Tian, L., Wang, J., Fong, M.P., Chen, M., Cao, H., Gelvin, S.B. and Chen, Z.J. (2003) Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase 1 (*AtHDT1*) expression. *Genetics*, **165**, 399–409.
- Verdel, A., Seigneurin-Berny, D., Faure, A.K., Eddahbi, M., Khochbin, S. and Nonchev, S. (2003) HDAC6-induced premature chromatin compaction in mouse oocytes and fertilised eggs. *Zygote*, **11**, 323–328.
- Vlachonasis, K.E., Thomashow, M.F. and Triezenberg, S.J. (2003) Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect *Arabidopsis* growth, development, and gene expression. *Plant Cell*, **15**, 626–638.
- Wang, Q., Yin, S., Ai, J.S., Liang, C.G., Hou, Y., Chen, D.Y., Schatten, H. and Sun, Q.Y. (2006) Histone deacetylation is required for orderly meiosis. *Cell Cycle*, **5**, 766–774.
- Weigel, D., Ahn, J.H., Blázquez, M.A. et al. (2000) Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**, 1003–1113.
- Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brown, D. and Miki, B. (2000) Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **22**, 19–27.
- Wu, K., Zhang, L., Zhou, C., Yu, C.W. and Chaikam, V. (2008) HDA6 is required for jasmonate response, senescence and flowering in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **59**, 225–234.
- Yamada, T., Mizuno, K.I., Hirota, K., Kon, N., Wahls, W.P., Hartsuiker, E., Murofushi, H., Shibata, T. and Ohta, K. (2004) Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *EMBO J.* **23**, 1792–1803.
- Yang, X., Timofejeva, L., Ma, H. and Makaroff, C.A. (2006) The *Arabidopsis* SKP1 homolog ASK1 controls meiotic chromosome remodeling and release of chromatin from the nuclear membrane and nucleolus. *J. Cell Sci.* **119**, 3754–3763.
- Zickler, D. and Kleckner, N. (1998) The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 619–697.

## **HISTONE MODIFICATION DYNAMICS DURING MALE MEIOSIS IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

CREMONA G.\*, AIESE CIGLIANO R.\*, CONSIGLIO M.F.\*, VIOTTI A.\*\*\*, CONICELLA C.\*

\*) CNR-IGV, Institute of Plant Genetics, Research Division Portici, Via Università 133, 80055 Portici (Italy)

\*\*) CNR-IBBA, Institute of Biology and Agricultural Biotechnology, Via Bassini 15, 20133 Milano (Italy)

### *Acetylation, methylation, immunofluorescence*

Epigenetic states, and particularly histone post-translational modifications, i.e. phosphorylation, acetylation, methylation and ubiquitination, are increasingly recognized as playing important roles in chromatin organization during meiosis. These modifications can alter chromatin structure by affecting the interaction of histones between adjacent nucleosomes or with DNA and/or even by collectively establishing a histone code recognized by downstream effector proteins and complexes.

Histone acetylation and methylation involve the modification of different lysine residues mainly in the amino terminal region of H3 and H4 histone proteins. Histone acetylation plays a role in meiotic progression, recombination, and chromosome segregation, as evidenced in yeast and mammals. Moreover, cytological observations in mammalian oocytes showed that the equilibrium between the acetylation and deacetylation state of the chromatin shifted during meiosis. Similarly, histone methylation is essential for several aspects of meiotic chromosome pairing and recombination. Observations of mammalian oocytes revealed that, in contrast to acetylation, histone methylation appears to be relatively stable during meiosis.

To date, histone acetylation and methylation dynamics were not deeply investigated in plant meiosis and only brief descriptions have been reported relatively to some stages in plant meiotic mutants. In the present study, we investigated histones H3 and H4 acetylation and H3 methylation during male meiosis in *Arabidopsis thaliana* to infer relationships between histone marks and crucial meiotic events. In particular, immunocytochemical experiments were performed by antibodies raised against acetylated lysine (K) at both residues 9 and 14 or only residue 9 of histone H3 (H3K9/14ac, H3K9ac), and acetylated K5 or K16 of histone H4 (H4K5ac, H4K16ac) in Col-0 ecotype. Moreover and preliminarily, the occurrence of methylated lysine was investigated using an antibody against trimethylated K4 of histone H3 (H3K4me3). The results showed that the patterns of histone acetylation in male meiocytes were meiotic stage-dependent and lysine residue-specific, while the distribution of H3K4me3 was stable during the stages of meiosis so far examined.

## ANALYSIS OF *PARALLEL SPINDLES-LIKE* GENE FAMILY IN PLANTS

AIESE CIGLIANO R.\*, SANSEVERINO W.\*\*\*, CREMONA G.\*, PAPARO R.\*, CONSIGLIO M.F.\*, CONICELLA C.\*

\*) CNR-IGV, Institute of Plant Genetics, Research Division Portici, Via Università 133, 80055 Portici (Italy)

\*\*) Department of Soil, Plant, Environment and Animal Production Sciences, University of Naples Federico II, Via Università 100, 80055 Portici (Italy)

*Potato, PS, 2n gametes, sexual polyploidization*

Polyploidy was estimated to occur in angiosperms from 30% to 80% of the species that include also important economic crops such as wheat, banana, potato, and alfalfa. Several works postulate that polyploids originated from genetic mutations leading to diploid ( $2n$ ) gametes. Furthermore,  $2n$  gametes emerged as a significant tool in the development of new breeding strategies. For instance,  $2n$  gametes have been used in potato to transmit useful traits from diploid wild relatives to tetraploid cultivated genotypes (*Solanum tuberosum*) through crossing schemes based on sexual polyploidization.

In *Solanum* spp., different cytological mechanisms leading to meiotic nuclear restitution were identified and a single recessive mutation in a gene termed *PARALLEL SPINDLES* (*PS*) was suggested to be responsible of one of these mechanisms causing  $2n$  gametes. However, the genomic complexity of *Solanum* species delayed functional study of *PS* gene. Recently, d'Erfurth and colleagues (PLoS Genet 2008, 4) provided the first molecular analysis of *PS* homologue (*AtPS1*) in *Arabidopsis* mutants displaying diploid pollen.

Taking advantage of the characterization of *AtPS1* gene a sequence-homology-based strategy was employed to isolate *PS-like* sequences in a diploid ( $2n = 2x = 24$ ) potato clone. We isolated seven cDNAs and one genomic clone sharing 33-37% and 44% of nucleotide identity with *AtPS1* cDNA and genomic sequences, respectively. Molecular and phylogenetic analysis of potato *PS-like* sequences confirmed a more complicated landscape of this family respect to *Arabidopsis* in which only one locus has been identified. Indeed, differentially spliced cDNAs were found and the existence of at least three different *PS-like* loci was inferred. Moreover, preliminary analysis of *PS-like* genes in different plant families showed a various degree of complexity. For instance, in *Glycine max* four loci were identified on public databases. Further bioinformatic studies will be carried out to get more hints about the evolution of *PS-like* gene family.



## HISTONE ACETYLATION CONTROLS MEIOTIC CROSSOVER DISTRIBUTION IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

AIESE CIGLIANO R., PERRELLA G., CREMONA G., PAPARO R., CONSIGLIO M.F.,  
CONICELLA C.

Institute of Plant Genetics (IGV) – CNR, Portici, Via Università 133, 80055 Portici (Italy)

*Histone acetylation, meiosis, Arabidopsis, chiasmata*

Traditional plant breeding techniques are based on genetic exchange (crossovers) during homologous recombination in meiosis which creates new combinations of alleles. The frequency and distribution of meiotic crossovers (COs), affecting the number of loci that recombine, are a major constraint to future crop improvement. In cereal crops, for example, COs are predisposed to the ends of the chromosomes such that about 30-50% of the genes rarely recombine.

Post-translational modifications of histones during meiosis are being recognized as playing important roles in chromosome structure, recombination and segregation in several organisms but in spite of their importance the precise function and regulation are sketchy in plants.

Following activation tagging approach, a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana* was isolated leading to the over-expression of the histone acetylase *MEIOTIC CONTROL OF CROSSOVERS 1 (MCC1)* (Perrella et al. 2010, Plant J 62(5): 796-806). Enhanced expression of *MCC1* caused histone hyperacetylation in male meiosis as revealed by immunolocalization with H3K9K14Ac antibody. Moreover, *mcc1* exhibited an early flowering, a reduced fertility with siliques carrying few seeds and a lower terminal height as compared to wild type. Cytological analysis of microsporogenesis showed meiotic defects such as aberrant chromosome condensation at diakinesis and univalent chromosomes at metaphase I. At meiosis II, the disjunction of sister chromatids occurred asynchronously in *mcc1* and migration of the chromatids towards the poles was irregular giving rise to an unequal sister chromatid distribution at telophase II. Female meiosis was also investigated in *mcc1* revealing defects similar to those observed in male meiosis. Fluorescent *in situ* hybridization on male meiocytes with 45S and 5S rDNA probes indicated that the univalents were exclusively nucleolar chromosome 2. Furthermore, analysis of chiasma frequency showed that elevated *MCC1* did not affect crossover number per cell, but has a differential effect on individual chromosomes elevating COs for chromosome 4, in which there is also a shift in chiasma distribution, and reducing COs for chromosome 1 and 2. The observed meiotic defects led to abortion in about half of the male and female gametes in the mutant.

In wild type, the treatment with the inhibitor of histone deacetylases, trichostatin A, phenocopies *MCC1* over-expression in meiosis.

Our work demonstrated for the first time in plant that histone acetylation has a significant impact on the control of meiotic recombination. For this reason, we started a systematic analysis of genes involved in histone modifications and chromatin remodeling in order to identify factors controlling meiotic recombination in higher plants.

# CHANGES IN HISTONE ACETYLATION DURING MALE MEIOSIS IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

CREMONA G., CONSIGLIO M.F., AIESE CIGLIANO R., CONICELLA C.

*CNR-Institute of Plant Genetics, UOS Portici, Via Università 133, 80055 Portici (Italy)*

Epigenetic states, and particularly histone modifications are increasingly recognized as playing important roles in chromosome organization during meiosis. Histone acetylation may influence chromatin structure by altering the interactions of histones between adjacent nucleosomes or with the DNA and/or by collectively establishing a code recognized by downstream effector proteins and complexes. In some mammalian oocytes, the equilibrium between the acetylation/deacetylation state of the chromatin is shifted dramatically during meiosis. To date, histone acetylation dynamics was not exhaustively investigated in plant meiosis. Only brief descriptions have been reported relatively to some stages in plant meiotic mutants. However, studies performed in other organisms indicate that histone acetylation play a role in meiotic progression, meiotic recombination, and chromosome segregation. In the present study, we investigated the acetylation state in all stages of male meiosis in *Arabidopsis thaliana* using a panel of antibodies specific for acetylated forms of histone H3 and H4. In particular, immunocytochemical experiments were performed by antibodies raised against acetylated lysine 9 and 14 of histone H3 (Ac-H3K9K14) and acetylated lysine 5 and 16 of histone H4 (Ac-H4K5, Ac-H4K16) in Col-0 ecotype. The results showed that the patterns of histone acetylation in male meiocytes were meiosis stage-dependent and lysine residue-specific.

# VIII Corso di approfondimento sulla genetica vegetale

Assisi, 8-11 giugno 2009

**Modulo di iscrizione** - Inviare per e-mail a [roselli@unipg.it](mailto:roselli@unipg.it) - **Deadline: 14 Maggio 2009**

## Abstract of the research project

TITLE	IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL ANALYSIS OF MEIOTIC GENES IN PLANT
AUTHOR (Participant only)	GAETANA CREMONA
INSTITUTION	CNR-IGV (PORTICI)
TEXT (Max 1800 caratteri spazi inclusi)	<p>In plant sexual reproduction, meiosis is the crucial event separating sporophytic and gametophytic generations. Despite the importance of its applicative potential, the molecular mechanisms that regulate meiosis are not well understood. The aim of this study is to identify genes involved in male meiosis in tomato and in the model plant <i>A. thaliana</i>. In order to investigate genes expressed during male meiosis in tomato, a cell-specific transcriptional profiling will be applied by using meiocytes at pre-meiotic/meiotic stages and uninucleate microspores. These cells were captured from the sectioned anthers using Laser Capture Microdissection (LCM) system. Basically, a thermoplastic film adheres to the cells selected with an inverted microscope. Evidences in other species indicates that LCM is a powerful tool for isolating specific tissue, cell types and organelles in a manner conducive to the extraction of RNA, DNA or protein.</p> <p>In <i>A. thaliana</i>, we will investigate the influence of histone acetylation on meiotic recombination. This histone post-translational modification may influence chromatin structure by affecting the interactions of histones between adjacent nucleosomes or with DNA and/or by collectively establishing a code recognized by downstream effector proteins and complexes. Based on our own studies of a line over-expressing the histone acetylase gene <i>MCC</i> we will pay particular attention to distribution of the chiasmata (CO sites) as this information could be particularly valuable for applications in crop species. Knockout mutant lines for histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs) have been analysing phenotypically to determine if there is any effect on fertility. Selected lines will then be analyzed using cytological and immunological approaches.</p>

COGNOME	NOME	Istituzione
CREMONA	GAETANA	ISTITUTO DI GENETICA VEGETALE – PORTICI (CNR-IGV)

Laurea in	Conseguita il	Anno di corso di dottorato (1,2 o 3)	Oppure	Assegnista o Borsista
SCIENZE BIOTECNOLOGICHE	16 LUGLIO 2002	2		
Tel	Fax	E-mail		
3382648820		sarabc@tiscali.it		